Beteiligung bakterieller Replikationsfunktionen an der DNS-Synthese des Salmonella Phagen P22

Ursula Schanda-Mulfinger

1979

Beteiligung bakterieller Replikationsfunktionen an der DNS-Synthese des Salmonella Phagen P22

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Ursula Schanda-Mulfinger
aus
Lenggries
Juli 1979

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1975 bis Juli 1979 am Genetischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Horst Schmieger durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Schmieger

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Karl Otto Stetter

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 1979

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	5
2.1	Bakteriophagen	5
2.2	Bakterienstämme	6
2.3	Medien	8
2.4	Puffer und Lösungen	9
2.5	Chemikalien und Enzyme	10
2.6	Methoden	11
2.6.1	Übernachtkulturen (ÜK)	11
2.6.2	Pulsmarkierung der bakteriellen DNS	11
2.6.3	Lysogenisieren von Bakterien	11
2.6.4	Bestimmung von Phagentitern	12
2.6.5	Vergleich der Lebendkeimzahl (LKZ) von Bakterien	12
2.6.6	Bestimmung der efficiency of plating (eop)	12
2.6.7	Phagenvermehrung	12
2.6.8	Präparation von P22 Schwanzpartikeln	13
2.6.9	Transduktion mit dem Phagen P1	14
2.6.10	Konzentrieren von Phagenlysaten	14
2.6.11	Reinigen der konzentrierten Phagen	14
2.6.12	Isolierung von Phagen-DNS	15
2.6.13	Spaltung der DNS mit Restriktionsendonukleasen	15
2.6.14	Agarose-Gelelektrophorese	15
2.6.15	F-Duktion mit dem F'lac-Episom	15
2.6.16	UV-Induktion	16
2.6.17	Einstufenwachstumsexperimente	16
3.	Ergebnisse	17
3.1	Vermehrung des P22 in E. coli dna_{ts}-Mutanten	18
3.1.1	Herstellung P22-lysogener E. coli dna_{ts}-Mutanten	18
3.1.2	UV-Induktion des P22 in E. coli	19
3.1.3	Pulsmarkierung der bakteriellen DNS	24
3.1.4	UV-Induktion des Phagen λ in E10 und E16	26
3.2	Versuche mit einem λ/P22-Hybrid	28
3.2.1	P22Hy200 - ein λimmP22repP22-Hybrid	28
3.2.2	Kartierung von P22Hy200 mit Restriktionsenzymen	30
3.2.3	Einstufenwachstumsexperimente mit P22Hy200	34

3.3 Versuche zum Wachstum von P22Hy200 in dnaB-Mutanten 41
3.3.1 Test von P22Hy200 in verschiedenen $dnaB_{65}$-Mutanten 41
3.3.2 Phagenproduktion von P22Hy200 in E58 52
3.3.3 Liegt eine Protein/Protein-Wechselwirkung vor? 54

4. Diskussion 58

5. Zusammenfassung 67

6. Literaturverzeichnis 68

Verwendete Abkürzungen:

ATP	Adenosintriphosphat
CM	Chloramphenicol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
eop	efficency of plating
LKZ	Lebendkeimzahl
moi	multiplicity of infection
NG	N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin
pfu	plaque forming units
RNS	Ribonukleinsäure
TCA	Trichloressigsäure
ÜK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Seit der Aufklärung der Struktur der Erbsubstanz, der Desoxyribonukleinsäure (DNS), durch Watson und Crick im Jahre 1953 /132/ ist es eine der großen Aufgaben der molekularen Biologie, den Mechanismus des fehlerfreien Kopierens der Erbinformation, die DNS-Replikation, zu erforschen. Seit Beginn der sechziger Jahre konzentriert sich das Interesse auf die enzymatischen Vorgänge bei der Verdopplung der DNS.
Als Studienobjekte für diesen komplexen Vorgang haben sich relativ einfache Organismen wie Bakterien und Bakteriophagen bewährt. Im Verlauf von fast zwei Jahrzehnten wurde eine ganze Reihe von Bakterienmutanten, hauptsächlich von Escherichia coli, isoliert, bei denen Enzyme, beteiligt an der DNS-Replikation, defekt sind. Ein Totalausfall einer solchen dna-Funktion ist für die betroffene Zelle aber unweigerlich letal. Daher sind diese Mutanten konditional letal. In diesem Fall handelt es sich dabei meist um eine Thermosensitivität, bedingt durch eine missense-Mutation, die das entsprechende Protein bei niedriger Temperatur seine Funktion ausüben läßt, bei hoher Temperatur aber zum Ausfall der Aktivität führt.
Diese dna_{ts}-Funktionen, die verstreut über das gesamte E. coli Chromosom lokalisiert sind, fallen in mindestens drei große Gruppen:

(a) Enzyme, die an der Synthese von DNS-Vorstufen beteiligt sind, wie z.B. das Produkt des Genes dnaF, eine Ribonukleosiddiphosphatase /134/.

(b) Enzyme, die für die Initiation am Replikationsorigin verantwortlich sind. Da hier zwar keine neuen Replikationsrunden begonnen, aber einmal angefangene beendet werden, kommt die DNS-Synthese nur langsam zum Stillstand. Zu dieser Gruppe gehören z.B. die Produkte der Gene dnaA, dnaC(D), dnaI und dnaP /1, 3, 8, 9, 10, 11, 13, 33, 49/.

(c) Enzyme, die an der Elongation beteiligt sind. Da bei einem Ausfall dieser Funktionen die DNS-Polymerisation nicht mehr abläuft, hört die DNS-Synthese sofort auf. Hierzu zählen z.B. die Produkte der Gene dnaB, dnaE, dnaG und dnaZ /2, 13, 16, 33, 48, 136, 137, 138/.

Einige dna_{ts}-Genprodukte konnten noch nicht genau diesen Gruppen zugeordnet werden. Dies trifft vor allem auf die Proteine zu, die von den Genen dnaH, dnaJ, dnaK, dnaL, dnaS und dnaQ codiert werden /14, 16, 47, 87, 139/.
Einblicke in die biochemische Funktion von dna-Genprodukten von E. coli wurden durch die Verwendung von Bakteriophagen gewonnen. Die Gruppe der Phagen setzt sich aus den unterschiedlichsten Vertretern zusammen. Neben der Klassifizierung in DNS und RNS enthaltende Phagen unterscheidet eine

gängige Einteilung zwischen virulenten und temperenten Phagen. Bei den virulenten, z.B. T4 und ΦX174, läuft nach der Infektion der Wirtszelle stets ein lytischer Zyklus ab, während die temperenten das Bakterium lysogenisieren können, d.h. das Phagengenom wird entweder in das bakterielle Chromosom integriert (bei λ und P22) oder die Phagen-DNS liegt in der Wirtszelle als stabiles Plasmid vor (P1).
Die Phagen-DNS entspricht dem von Jacob et al. 1963 postulierten "Replikon" /141/, d.h. sie besitzt einen Replikator (im allgemeinen als origin bezeichnet) und ein Initiatorgen, dessen Genprodukt den Replikator erkennt und die DNS-Replikation startet. Zusätzlich zu diesem phagencodierten Initiatorprotein werden von vielen Phagen aber auch Replikationsproteine des bakteriellen Wirtes verwendet. In hohem Maß trifft dies auf den kleinen E. coli Phagen ΦX174 zu. Die Verwendung dieses Phagen als Testobjekt konnte daher wesentlich zur Aufklärung der enzymatischen Vorgänge bei der DNS-Replikation beitragen.
In in-vitro-Tests mit der DNS des Phagen ΦX174 und einiger verwandter Phagen als Substrat und Enzymextrakten und teilweise gereinigten Proteinen von E. coli konnte die Funktionsweise der Genprodukte von dnaB /93, 112, 115, 117, 118/, dnaG (Primase) /99, 102, 103, 116, 142/, dnaE (Polymerase III) /136, 137, 143/ und dnaZ (Bestandteil des Elongationsfaktors II) /144, 145/ geklärt werden. Auch Enzyme wie die RNS-Polymerase (rpoB) /50, 146, 147/, die DNS-Ligase (lig) /148, 149/ und die Polymerasen I (polA) und II (polB) /6, 157, 158/ greifen in die DNS-Replikation ein (Modelle für die Aktionsweise der dna-Proteine sind in /117/ und /150/ vorgestellt). Einige der im in-vitro-Test benötigten Proteine, u.a. i, n, Elongationsfaktor I und III /126/ bzw. X, Y, Z /100/, konnten bis jetzt noch keinem dna-Genort zugeordnet werden.
Auffallend ist, daß hauptsächlich die Funktionsweise von solchen Genprodukten aufgeklärt werden konnte, die an der Elongation beteiligt sind, während eine eindeutige Zuordnung für bakterielle Initiationsproteine bis jetzt nicht möglich war. Dies deutet darauf hin, wie spezifisch der Initiationsprozess für jeden Organismus sein muß. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, daß bei vielen Organismen der Replikationsorigin nahe bei oder in einem Initiatorgen liegt /13, 33, 50, 88, 97, 129, 151, 152, 153/.
Eine Zusammenstellung der Ab- bzw. Unabhängigkeiten verschiedener E. coli Phagen von den dna-Funktionen des Wirts in Tab.1 zeigt, daß fast alle Phagen von den bakteriellen Elongationsfunktionen abhängig sind. Ausnahmen bilden nur der virulente Phage T4, der mehr als 20 eigene DNS-Replikationsproteine selbst codiert und der temperente Phage P1, der ein dnaB-analoges Protein exprimiert. Als Vertreter der temperenten Phagen, die in das Wirtschromosom integrieren können, ist der E. coli Phage λ relativ gut untersucht. Die Tab.1 zeigt, daß auch dieser Phage alle geprüften Elongationsfunktionen des Bakteriums braucht, aber unabhängig von den Initiationsgenprodukten des Wirts ist.

Phage	Typ	Initia. A C I P	K	Elongation B E G Z lig	Referenzen
T4	DS	+ + +	+	+ +	1,2,3,4,5,7,13,15,16,21,
P1	DS	+		+ -	5,6,7,15,
λ	DS	+ + +	-	- - - - -	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12, 13,14,15,16,21,96
ΦX174	SS	+ - + +	+	- - - - -	7,21,56,57,58,59,60,61,62,63 64,68
G4	SS	+ -		- - - -	64,65,66
ΦK	SS	+ + + +	+	+ - - - -	64,67,68

Tab.1: Wachstum verschiedener Phagen in E. coli dna_{ts}-Mutanten bei nichtpermissiver Temperatur. Phagen vom Typ DS haben doppelsträngige DNS, solche vom Typ SS einzelsträngige. + bedeutet: der Phage vermehrt sich in einem Stamm, der im bezeichneten Gen mutiert ist, bei nichtpermissiver Temperatur, -: es findet keine Phagenvermehrung statt.

Da die temperenten Phagen nicht immer sofort nach der Infektion der Wirtszelle in den lytischen Zyklus übergehen, sondern dies auch aus dem lysogenen Stadium heraus tun können, dürfte bei diesen Vertretern der Bakteriophagen eine komplexere Wechselwirkung zwischen den bakteriellen dna-Genprodukten und den eigenen Replikationsproteinen vorliegen. Hinweise darauf finden sich beim temperenten E. coli Phagen λ, der im Gegensatz zu den virulenten Phagen T4, ΦX174 und ΦK abhängig von dnaK ist.
Wie umfassend eine solche Interaktion sein muß, zeigen einige Untersuchungen mit dem Phagen P22. Der Wirt dieses temperenten Phagen ist Salmonella typhimurium. Eine Besonderheit des Phagen ist seine Fähigkeit allgemein zu transduzieren /156/. Bei einer Transduktion werden statt der Phagen-DNS bakterielle Gene in die Phagenhülle verpackt und durch diese Partikel in andere Bakterien übertragen. Die Herkunft dieser bakteriellen DNS ist beim Phagen P22 nicht auf die Sequenzen beschränkt, die dem Integrationsort benachbart sind, auch weit entfernte Gene können transduziert werden. Bei der Analyse solcher transduzierender P22 Partikel fiel auf, daß ein kleiner Prozentsatz bakterielle DNS enthielt, die nach der Phageninfektion synthetisiert worden war, und zwar nicht durch die normale chromosomale Replikation, sondern unter Kontrolle des Phagen (Backhaus und Schmieger, 1974) /140/. Versuche, die mit einer initiationsdefekten Salmonella Mu-

tante durchgeführt wurden, zeigten, daß die Replikation dieser bakteriellen DNS-Sequenzen auch bei abgeschalteter bakterieller DNS-Replikation stattfand /155/. Eine solche phagenspezifische DNS-Replikation könnte z.B. verursacht werden durch phagencodierte Genprodukte, die Analoge zu bakteriellen dna-Enzymen darstellen und für beide Systeme aktiv sein können.
Die DNS-Replikation des Phagen P22 ist noch wenig untersucht, und es ist kaum etwas über das Ausmaß bekannt, in dem sich der Phage P22 des Replikationsapparates des Wirts bedient. Einzig die Unabhängigkeit dieses Phagen vom dnaA-Genprodukt von Salmonella typhimurium (Initiation, analog zu E. coli dnaA /26/) ist nachgewiesen /34/.
In dieser Arbeit sollte daher versucht werden, die Ab- bzw. Unabhängigkeit des Salmonella Phagen P22 von bakteriellen dna-Funktionen zu klären. Weiter sollte festgestellt werden, ob eine Unabhängigkeit von einer bestimmten Funktion auf einer Nichtbeteiligung des betreffenden Replikationsproteins an der P22-gesteuerten DNS-Replikation beruht, oder ob Proteine mit analogen Funktionen vom Phagen selbst codiert werden. Da aber vom natürlichen Wirt des Phagen, Salmonella typhimurium, nur 2 dna_{ts}-Mutanten bekannt sind /26, 27/, sollte aufgrund der nahen Verwandtschaft zwischen S. typhimurium und E. coli auf die Vielzahl gut charakterisierter dna_{ts}-Mutanten von E. coli zurückgegriffen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Bakteriophagen

Alle verwendeten Phagen sind in Tab.2 aufgeführt.

Kurzbez.	Wirt	Beschreibung	Herkunft
H1	Salmon.	P22 Wildtyp	Labor
H5	"	P22 c_2^- Klarplaquemutante	"
am8.13.	"	P22 c_2^- amber-Mutante in einem Kopfprotein und einer Lysis-funktion	"
λ	E.coli	Wildtyp	
λc^-	"	spontane Klarplaquemutante	Eigenisol.
P22Hy180	"	λimmP22repP22 Hybrid	"
P22Hy200	"	spontane Klarplaquemutante von P22Hy180	"
λimA	"	cb_2, A Mutation in Gen P	G.Kellenber-
λimB	"	cb_2, B Mutation in Gen P	ger-Gujer
P1vir^s	"	virulente Mutante von P1	D'Ari
P1CMbac	"	P1 Mut. mit konstitutivem ban, trägt CM Resistenz	"
T4	"	Wildtyp	Labor
T4amB	"	B17 amber-Mutante von T4	"
T4amN	"	N120 amber-Mutante	"

Tab.2: Verwendete Bakteriophagen

2.2 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tab.3 zusammengefaßt. E. coli Stämme führen ein "E" vor der Nummer, Salmonella typhimurium Stämme ein "S". Enthält ein Stamm einen F'-Faktor, ist dieser hinter einem Schrägstrich nach der Stammnummer angegeben. Bei Stämmen, die einen Prophagen enthalten, wird dieser hinter der Stammbezeichnung in Klammern aufgeführt. Trägt der F'-Faktor einen Phagen, steht dieser in Klammern hinter dem F'-Faktor.

Nr.	Bezeichnung	relevanter Genotyp	Herkunft
S1	LT-2	prototropher Wildtyp	Labor
S3	4253	LT-7, $hsd_{LT}30$ ($r^- m^-$)	"
S25	2012	proAB47(del), F'pro^+lac^+(P22)	"
E1	GL290	dna^+, F^-, str-r, λ^R, proA, lac^-	M.Yarmolinsky
E2	GL313	dnaA46,F^-,str-r, λ^R, proA, lac^-	"
E4	GL260	dnaC325,F^-,str-r, proBlac(del)	"
E5	CR34	dna^+, F^-, str-s, thr^-, leu^-, lac^-	"
E6	JW111	dnaE486, F^-, str-r, lac^-	"
E9	Q1008	dna^+, F^-, str-r, lac(am), su^-	"
E10	Q1508	dnaB70, F^-, str-r, thyA, lac(am), su^-	"
E16	CR34/43	dnaB43,F^-,str-r, thyA, lac^-, su^+	F.Bonhoeffer
E18	1047	dnaB1047	"
E20	CR34	dna^+, F^-, str-r, lac^-	"
E21	BT308	dnaG308, F^-, str-r, lac^-	"
E22	AX727	dnaZ2016, str-r, lac^-	A.Taketo
E24	GR756	dnaK756	R.D'Ari
E27	Q1503	dnaB22, su^-	Touati-Schwartz
E29	Q1505	dnaB42, su^-	R.D'Ari
E33	Q1509	dnaB107, su^-	Touati-Schwartz

E34 Q1511	dnaB279, su$^-$	R.D'Ari
E37 Q1514	dnaB454, su$^-$	"
E39 Q1516	groPB585, trp(am), lac(am), su$^-$	"
E40 Q1519	dnaB142, su$^-$	D.Touati-Schwartz
E48 KH299	lig321(am), sup126(ts)	T.Nagata
E49 Hfr165/120/6	dnaB252	H.Schuster
E50 BT1071	dnaB1071	"
E51 BT1304	dnaB1304	"
E53 Q1710	dnaB266(am), supF	"
E54 Q1610	dnaB266(am), supE	"
E55 Q1550-37	dnaB266(am), su$^-$, P1CMbac	"
E57 GR12	dna$^+$, su$^-$	"
E58 GR7	groPB558, su$^-$	"
E64 490AT$_6^R$(P22)	str-s,lac$^-$,met$^-$, thr$^-$, leu$^-$, recA, F'pro$^+$lac$^+$(P22)	Labor
E68 490A/F'	str-s, recA, F'pro$^+$lac$^+$	"
E73 E39(su$^+$)	groPB585, trp(am), lac(am), supE44	Eigenisolat
E74 C600	dna$^+$, supE44	Labor

Tab.3: Verwendete Bakterienstämme. "S"-Nummern sind Salmonella typhimurium Stämme, "E"-Nummern Escherichia coli Stämme. Viele dieser Bakterienstämme sind polyauxotroph, hier ist aber nur der Genotyp angegeben, der für die Versuche in dieser Arbeit wichtig ist. Der groP-Charakter wurde mit den Phagen λ, $\lambda\pi$A und $\lambda\pi$B geprüft, die Anwesenheit von Suppressoren mit den Phagen T4, T4amB und T4amN.

2.3 Medien

a) NB-Medium

Bacto-Nutrient Broth	8g
NaCl	5g
H_2O, entionisiert	1l

b) NB-Platten

NB-Medium + 1.5% Bacto-Agar

c) NB-Weichagar

NB-Medium + 0.7% Bacto-Agar

d) GTM-Medium /17/

Bacto-Pepton	8g
Bacto-Trypton	5g
NaCl	5g
H_2O, entionisiert	1l
$MgSO_4$	2.5g

e) GTM-Platten

GTM-Medium + 1.2% Bacto-Agar

f) GTM-Weichagar

GTM-Medium + 0.6% Bacto-Agar

g) PEN-Medium (Bacto Antibiotic Medium 3)

Bacto-Pennassy Broth	17.5g
H_2O, entionisiert	1l

h) M9-Medium

Na_2HPO_4 x 12 H_2O	15.0g
KH_2PO_4	3.0g
NaCl	1.0g
NH_4Cl	1.0g
H_2O, entionisiert	1l

Nach dem Autoklavieren werden zugesetzt:

$MgSO_4$ 0.1M	10ml
Zuckerlösung 20%	10ml

Der Zucker wird hinter dem Medium angegeben, z.B. M9lac bedeutet M9 mit Lactose als Kohlenstoffquelle. Nach Bedarf werden L-Aminosäuren und Thymidin in einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugegeben.

i) M9-Platten

M9-Medium + 1.5% Bacto-Agar

k) TCG-Medium /18/

Glucose-Lösung 20%	2ml
NaCl-Lösung 25%	0.2ml
Na_2SO_4-Lösung 0.1M	0.16ml
KH_2PO_4-Lösung 0.1M	0.32ml
$MgSO_4$-Lösung 0.1M	0.1ml
$CaCl_2$-Lösung 1.0M	0.14ml
$FeCl_3$ 0.01M	0.03ml

Tris/HCl-Puffer, pH7.4, 0.1M 100ml
L-Aminosäuren werden nach Bedarf in 20 µg/ml Endkonzentration supplementiert. Die Thymidinkonzentration richtet sich nach dem Verwendungszweck (siehe 2.6.2).

2.4 Puffer und Lösungen

a) Verdünnungsflüssigkeit (VF)

Bacto-Trypton	1g
NaCl	10g
H_2O, entionisiert	1l

b) VFM

$MgSO_4$	2.5g
VF	1l

c) gepufferte Saline
Sørensenphosphatpuffer, pH7.0, 1/150M in 0.85% NaCl

d) Tris/HCl-Puffer, pH7.4
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 1M bzw. 0.1M, wird in entionisiertem Wasser gelöst und der pH mit HCl auf 7.4 eingestellt.

e) TMG-Puffer

Tris	6g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	2.5g
Gelatine	0.1g
H_2O, entionisiert	1l

pH 7.2, eingestellt mit HCl

f) Tris/EDTA-Puffer

Tris/HCl-Puffer, pH 7.4	0.01M
EDTA	2mM

g) Acetatpuffer
Na-acetat, 0.05M mit Essigsäure auf pH5.6 eingestellt

h) P1-dil

Tris, pH 7.4	0.02M
$MgSO_4$	0.01M
Ammoniumacetat	10g/l

i) Inkubationspuffer für EcoRI

Tris/HCl, pH 7.2	100mM
NaCl	50mM
$MgCl_2$	10mM

j) Inkubationspuffer für HindIII

Tris/HCl, pH 8.0	6.6mM
$MgCl_2$	10mM
2-Mercaptoäthanol	6.6mM

k) Elektrophoresepuffer

Tris/Acetat, pH 7.8	40mM
Na-acetat	20mM
EDTA	1mM
Äthidiumbromid	0.4µg/ml

l) M9-Puffer

Na_2HPO_4 x 12 H O	15g
KH_2PO_4	3g
NaCl	5g
$MgSO_4$ 1.0M	1ml
H_2O, entionisiert	1l

m) Szintillationsflüssigkeit

PPO	5g
dimethyl-POPOP	0.3g
Toluol	1l

2.5 Chemikalien und Enzyme

2-Desoxy-Thymidin, p.A., Serva Heidelberg
Thymidin-6-^{3}H, 24Ci/mmol, Amersham Buchler Braunschweig
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 99.8%, Serva Heidelberg
Äthylendinitrilotetraacetat, Dinatriumsalz (EDTA), p.A., Merck Darmstadt
Cäsiumchlorid, 99,5%, Merck Darmstadt
2-Mercaptoäthanol, Serva Heidelberg
Äthidiumbromid, reinst, Serva Heidelberg
PPO, dimethyl-POPOP, Packard
Toluol, Baker
Phenol, Merck Darmstadt
N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin, Serva Heidelberg
Seakem-Agarose, Marine Colloids USA
Polyäthylenglykol (PEG), Typ 6000, Merck Darmstadt
Cellulosenitratfilter, Selectron Typ BA85, ø 25 mm, PG 0.45 µm, Schleicher und Schüll
Dialyseschläuche, Union Carbide Corporation
Cellex E, Biorad USA
Streptomycinsulfat, Serva Heidelberg
EcoRI, Boehringer Mannheim
HindIII, Boehringer Mannheim

2.6 Methoden

2.6.1 Übernachtkulturen (ÜK)

5 ml des gewünschten Mediums werden mit 0.05 ml einer stationären Bakterienkultur angeimpft und im Rollbebrüter über Nacht inkubiert bei einer Temperatur, die für den entsprechenden Stamm permissiv ist. Die Kultur hat dann ca. 2×10^9 Zellen/ml.

2.6.2 Pulsmarkierung der bakteriellen DNS

DNS kann durch Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin selektiv markiert werden. Es wurde Thymidin-6-^{3}H verwendet. Eine an TCG-Medium adaptierte Bakterienkultur wird 1:100 in TCG-2 (TCG + 2 µg kaltes Thymidin/ml) verdünnt und bei der für das Wachtum permissiven Temperatur belüftet. Ist die logarithmische Wachstumsphase erreicht - die Zunahme der Zellmasse wird in einem Photometer (Spectronic 20, Bausch & Lomb) verfolgt - werden in Zeitabständen Proben von 200 µl entnommen und in 100 µl Markierungsmedium (TCG + 10 µCi Thymidin-6-^{3}H) pipettiert. Das Markierungsmedium ist auf die jeweilige Temperatur vorgewärmt. Nach 2 min Inkubationszeit wird der Einbau von radioaktivem Thymidin durch Zugabe von 5%iger eiskalter TCA gestoppt und die Probe ins Eis gestellt. Nach mindestens 30 min im Eisbad wird das säurefällbare Material (DNS) durch Filtration über vorgewaschene Cellulosenitratfilter gesammelt. Die Filter werden mit 10 ml eiskaltem entionisiertem Wasser nachgewaschen und dann bei 60°C getrocknet. Die eingebaute Radioaktivität wird in 10 ml Toluol-Szintillator im Szintillationszähler (MarkII, Nuclear Chicago) gemessen. Dieser Versuchsablauf ist angelehnt an die von Dopatka und Prell (1973) /20/ beschriebene Modifikation der Methode von Smith und Levine (1968) /22/.

2.6.3 Lysogenisieren von Bakterien

In 2 ml geschmolzenem Weichagar werden 2 Tropfen einer ÜK des gewünschten Bakterienstammes suspendiert und auf einer Platte verteilt. Nach Erstarren des Agars wird ein Tropfen des gewünschten Wildtypphagenstammes aufgebracht und die Platte über Nacht bebrütet. Aus dem trüben Zentrum des Tropfareals werden Zellen entnommen und über Einzelkolonieausstrich gereinigt. Einzelne Kolonien werden nun abisoliert und in Medium suspendiert. Durch einen Tropfen dieser Suspension auf einen geeigneten Indikator wird geprüft, ob ein intakter Phage freigesetzt wird (Lysishof im Tropfareal). Durch einen weiteren Tropftest kann festgestellt werden, ob die Bakterienkultur nun immun gegen den gleichen Phagenstamm geworden ist: die Einzelkoloniesuspension wird in Weichagar vorplattiert und der Phage wird aufgetropft. Im Tropfareal darf kein Lysishof entstehen.

2.6.4 Bestimmung von Phagentitern

a) Titration von P22 Lysaten

2 Tropfen einer frischen Salmonella ÜK werden mit 0.1 ml der geeigneten Phagenverdünnung in VF in 2 ml NB-Weichagar gemischt und gleichmäßig auf einer NB-Platte verteilt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht werden die Plaques ausgezählt.

b) Titration von E. coli Phagen

2 Tropfen einer E. coli ÜK werden mit 0.1 ml einer geeigneten Phagenverdünnung in VFM (für λ und P22Hy200) bzw. P1-dil (für P1) 10 min bei 37°C inkubiert (P1 in Anwesenheit von 2.5mM $CaCl_2$), dann mit 2 ml GTM-Weichagar gemischt und auf einer GTM-Platte (mit 2.5mM $CaCl_2$ bei P1) verteilt. Weiter wird wie bei a) verfahren.

2.6.5 Vergleich der Lebendkeimzahl (LKZ) von Bakterien

Getestet wird hier die Fähigkeit der Zellen bei unterschiedlichen Bedingungen Kolonien zu bilden. In diesem Fall wurde das Verhalten bei verschiedenen Temperaturen geprüft. Geeignete Verdünnungen frischer ÜKs in GTM-Medium werden auf GTM-Platten plattiert und über Nacht bei permissiver und nichtpermissiver Temperatur bebrütet. Die entstandenen Kolonien werden gezählt und der Titer berechnet. Der Vergleichswert ergibt sich dann durch die Division des Titers bei nichtpermissiver Temperatur durch den der permissiven.

2.6.6 Bestimmung der efficiency of plating (eop)

Hier wird die Vermehrungsfähigkeit der Phagen auf unterschiedlichen Wirten mit Mutationen bezüglich der DNS-Replikation geprüft. Als Standard wird der Phagentiter auf einem Stamm ermittelt, der bezüglich der untersuchten Funktion Wildtypeigenschaften hat. Das Verhältnis der auf den Mutanten ermittelten Titer zum Standardtiter ergibt den eop-Wert.

2.6.7 Phagenvermehrung

a) Vermehrung des Salmonella Phagen P22

Eine frische Salmonella ÜK wird 1:100 in NB-Medium verdünnt und auf einem Mini-Shaker (Braun-Melsungen) bei ca. 250 rpm und 37°C geschüttelt. Das Wachstum und der Zustand der Zellen werden unter dem Mikroskop geprüft. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen kann auch durch ein Durchströmen der Kultur mit Luft (Belüftung) erreicht werden. Ist eine Zelldichte von ca. 2×10^8 Zellen/ml erreicht, wird die Kultur infiziert. Die Klarplaquemutante H5 wird mit einer Multiplizität von 5 Phagenpartikel pro Zelle (moi 5) zugegeben. Wird der Wildtyp H1 vermehrt, muß die moi < 1 sein, um die Lysogenisierungswahrscheinlichkeit niedrig zu

halten. Die infizierte Kultur wird weiter inkubiert, bis sie durch die Lyse der Bakterien klar wird, aber nicht länger als 2 Stunden. Einige Tropfen Chloroform werden zugesetzt und das Lysat weitere 10 min inkubiert. Das Chloroform tötet die restlichen Bakterien ab. Die Zellrückstände werden durch 10 min Abzentrifugieren in der Minifuge (Heraeus-Christ) bei 5000 rpm entfernt. Der Phagentiter im Überstand wird auf einem geeigneten Indikatorstamm ermittelt. Falls es für den Versuchsablauf wichtig ist in welchem Bakterienstamm der Phage vermehrt wurde, wird dieser in Klammern hinter der Phagenbezeichnung angegeben, z.B. H1(S1).

b) Vermehrung von λ und P22Hy200

Um hochtitrige Lysate dieser Phagen zu erhalten, eignet sich am besten die Plattenvermehrung. 2 Tropfen einer frischen E. coli ÜK werden mit 10^4 - 10^5 Phagenpartikeln gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert (Phagenadsorption). 3 ml GTM-Medium und 5 ml GTM-Weichagar werden zupipettiert, auf einer GTM-Platte verteilt und bei 37°C oder 42°C 7 - 8 Stunden bebrütet. Nach einer Zugabe von 2 ml TMG-Puffer wird die Weichagarschicht der Platte abgenommen, kurz mit Chloroform inkubiert und 30 min bei 5500 rpm in der Minifuge (Heraeus-Christ) abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, um Verunreinigung mit Agar zu vermeiden. Weiter wird wie unter a) verfahren. Im Gegensatz zu P22 schadet diesen Phagen das Chloroform etwas, die Behandlung ist jedoch unvermeidlich, wenn die Phagenlysate steril sein sollen.

c) Vermehrung von P1

Prinzipiell ist das Verfahren wie für λ und P22Hy200, die Medien müssen jedoch zusätzlich 2.5mM $CaCl_2$ für die Adsorption des P1 enthalten. Da der lange Schwanz des P1 empfindlich gegen Scherkräfte ist, müssen P1 Lysate vorsichtig gemischt und langsam pipettiert werden.

2.6.8 Präparation von P22 Schwanzpartikeln /23/

Eine unter Belüftung bei 37°C logarithmisch wachsende Kultur S1 (su^-) von ca. 2×10^8 Zellen/ml wird mit dem Phagen am8.13. in einer moi von 5 angeimpft. Nach 90 min Inkubation werden die Zellen durch 8 min Zentrifugieren bei 5500g geerntet und in 1/100 Volumen gepufferter Saline aufgenommen. Die Suspension wird nun 10 min bei 37°C mit Chloroform behandelt, um die Zellen zu öffnen. Um ganze Phagenpartikel, die durch Leakiness der amber-Mutation entstanden sind, zu entfernen, wird die Suspension 15 min bei 35000g abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 70% Ammoniumsulfat gefällt und das Präzipitat 30 min bei 29000g gesammelt. Das Pellet wird in 2 ml gepufferter Saline gelöst und über Nacht gegen Acetatpuffer dialysiert. Das Dialysat wird 30 min bei 25000g abzentrifugiert und der Überstand 15 min auf 79°C erhitzt (Inaktivierung noch vorhandener ganzer Phagen) und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wird mit einem Lysat ti-

triert, das überwiegend Phagenköpfe ohne Schwanzpartikel enthält. Das Konzentrat wird über längere Zeit bei 4°C aufbewahrt.

2.6.9 Transduktion mit dem Phagen P1

0.1 ml ÜK des Empfängers wird mit P1vir^{s} (gezogen auf dem Spender) in Gegenwart von 2.5mM $CaCl_2$ mit einer moi < 0.5 infiziert. Nach 15 min bei 37°C wird das Gemisch in 5 ml GTM-Medium mit 2.5mM Na-citrat (verhindert die Adsorption des P1) pipettiert. Nach ca. 1 Generation Bakterienwachstum - zur Ausprägung der transduzierten Gene - wird die Kultur auf Selektivmedium (das ebenfalls Na-citrat enthält) plattiert. Nach 3 Tagen werden die entstandenen Kolonien über Einzelkolonieausstrich gereinigt und getestet.

2.6.10 Konzentrieren von Phagenlysaten

a) Konzentration des P22 über eine ECTEOLA-Säule

Eine Säule mit Cellex E (ECTEOLA) wird mit 1M NaOH equilibriert und mit sterilem entionisiertem Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Das Phagenlysat wird auf die Säule gegeben. Anschließend werden die an der Zellulose adsorbierten Phagen mit 0.3M NaCl eluiert.

b) Konzentrieren von λ und P22Hy200

In das Phagenlysat werden langsam 10 g PEG/100 ml verrührt, die Suspension bei Zimmertemperatur 30 min inkubiert und dann 15 min bei 14600g abzentrifugiert. Das Pellet, bestehend aus Phagen an PEG adsorbiert, wird in TMG-Puffer (1/10 des Ausgangsvolumens) aufgenommen. 1 ml 5M NaCl werden zu je 10 ml Suspension pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Bei dieser NaCl-Endkonzentration von 0.45M werden die Phagenpartikel vom PEG wieder abgelöst.

2.6.11 Reinigen der konzentrierten Phagen

Hierzu eignet sich am besten ein CsCl-Stufengradient. In einem 30 ml Cellulosenitratröhrchen werden 5 ml einer CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1.6 g/cm^3 mit 10 ml einer CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1.4 g/cm^3 vorsichtig überschichtet. Die Dichte der Lösungen wird im Refraktometer eingestellt /24/. Auf diesen Stufengradienten wird das über Säule oder PEG-Fällung konzentrierte Phagenlysat aufgebracht. Die Zentrifugation wird in der präparativen Ultrazentrifuge L-2 (Beckmann) im SW27.1-Rotor bei 23°C und 23000rpm durchgeführt. Nach 90 min wird der Lauf beendet. Die Phagen (Dichte 1.5 g/cm) sind nun in einer Bande an der Grenzschicht zwischen den beiden CsCl-Lösungen konzentriert. Sie werden durch eine Kanüle, mit der das Röhrchen von unten angebohrt wird, abgezapft und über Nacht gegen TMG-Puffer dialysiert, um das CsCl zu entfernen. Soll aus dem Lysat DNS

präpariert werden, müssen die Phagen zweimal gereinigt werden.

2.6.12 Isolierung von Phagen-DNS

Flüssiges destilliertes Phenol wird mit 0.1M Tris/HClPuffer, pH7.4 gesättigt. Die obere Phase wird verworfen. Ein CsCl-gereinigtes Phagenlysat wird mit dem gleichen Volumen puffergesättigtem Phenol versetzt und in einem Schraubröhrchen 20 min langsam gerollt. Nach der Phasentrennung wird die wäßrige obere Phase abgenommen. Die Phenolphase wird nochmals mit dem gleichen Volumen Puffer nachextrahiert. Die wäßrigen Volumen werden vereinigt und noch mindestens zweimal mit Phenol extrahiert, um den notwendigen Reinheitsgrad der DNS zu erreichen. Die DNS enthaltende wäßrige Phase wird anschließend dreimal mindestens 6 Stunden gegen Tris/EDTA-Puffer bei 4°C dialysiert. Dialyseschläuche, die für DNS-Präparationen verwendet werden, müssen vorher je 15 min in 0.1M $NaHCO_3$, 0.01M EDTA und zweimal in entionisiertem Wasser gekocht werden.
Die Reinheit der DNS wird in einem Spektralphotometer (Beckman) mittels des Quotienten E(260)/E(280) ermittelt. Dieser Quotient soll zwischen 1.6 und 2.0 liegen /109/. Die Menge der DNS wird durch die Extinktion bei 260 nm bestimmt; 1 µg DNS/ml entspricht einem Wert von 0.02. Wenn nötig wird die DNS nochmals durch Äthanolfällung gereinigt.

2.6.13 Spaltung der DNS mit Restriktionsendonukleasen

Ca. 1-10 µg Phagen DNS werden in 50 µl des entsprechenden Inkubationspuffer aufgenommen, mit 5 - 20 Einheiten Restriktionsenzym versetzt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch 10 min Erhitzen auf 60°C gestoppt. Dann werden die Proben mit ca. 10 µl 0.1% Bromphenolblau versetzt.

2.6.14 Agarose-Gelelektrophorese

0.7 bzw. 2.0% (w/v) Agarose werden in Elektrophoresepuffer bei 100°C gelöst. Nach Abkühlen unter 60°C wird zunächst ein Stützgel mit der 2%igen Agaroselösung in eine Gelkammer gegossen. Nach Erstarren dieses Blocks wird das eigentliche Gel mit den Probetaschen mit der 0.7%igen Lösung hergestellt. Die Proben werden aufgetragen, und die Elektrophorese bei einer Spannung von 120 V für 12 Stunden durchgeführt. Unter UV-Licht werden die DNS-Banden im Gel durch das eingelagerte fluoreszierende Äthidiumbromid sichtbar. Zur Dokumentation werden die Gele photographiert.

2.6.15 F-Duktion mit dem F'lac-Episom

0.5 ml ÜK von Spender und Empfänger in GTM-Medium werden gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird 0.5 ml frisches GTM-Medium hinzugefügt. Nach 6 Stunden Inkubation bei 28°C ohne Bewegung wird 1:10 in GTM-Medium verdünnt und über Nacht im Rollbebrüter weiter inkubiert. Ge-

eignete Verdünnungen werden nun auf M9lac-Platten aufplattiert. Die Platten enthalten 200 µg/ml Streptomycinsulfat zur Gegenselektion der Spenderzellen. Nach 3 - 6 Tagen werden Empfängerzellen mit F'lac isoliert und gereinigt.

2.6.16 UV-Induktion

Phagenlysogene E. coli Stämme werden bei 28°C bis zu einer Zelldichte von 2 x 10^8 Zellen/ml in geeignet supplementiertem M9lac-Medium gezogen. Die Zellen werden bei 5500 rpm in der Minifuge (Heraeus-Christ) geerntet und in eiskaltem M9-Puffer suspendiert. 5 ml Aliquots werden in Glaspetrischalen verschieden lang mit UV-Licht bestrahlt. Eine Probe bleibt unbestrahlt, sie dient als Nullwert. Die Proben werden abzentrifugiert, in vorgewärmtem M9lac-Medium aufgenommen und 3 Stunden bei der gewünschten Temperatur geschüttelt. Anschließend werden die Kulturen 10 min bei 28°C inkubiert, um das Kopf-Schwanz assembly zu ermöglichen. Dann werden die Proben mit Chloroform behandelt, um alle Zellen zu öffnen. Die Zelltrümmer werden bei 5500 rpm abzentrifugiert, die Lysate mit konzentrierten Schwanzpartikeln versetzt, so daß alle gebildeten Köpfe zu infektiösen Phagen vervollständigt werden, und diese dann auf einem geeigneten Indikator titriert.

2.6.17 Einstufenwachstumsexperimente

Die Bakterien werden in GTM-Medium bis zu einer Konzentration von ca. 2 x 10^8 Zellen/ml bei niedriger Temperatur gezogen, bei 5500 rpm in der Minifuge (Heraeus-Christ) abzentrifugiert und im gleichen Volumen TMG-Puffer gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren werden die Zellen in 1/10 Volumen vorgewärmtem GTM-Medium aufgenommen, je 1 ml in vorgewärmte Erlenmeyerkolben pipettiert und nach Bedarf vorinkubiert. Dann wird mit dem Phagen in der gewünschten moi infiziert. Nach 10 min Adsorptionszeit wird mit vorgewärmtem GTM-Medium auf 10 ml aufgefüllt und die Kulturen im Wasserbad geschüttelt. Für Experimente bei hoher Temperatur (37°C, 42°C) wurde ein Schüttelthermostat (Braun-Melsungen) mit einer Temperaturvarianz < 0.25°C, für Versuche bei niedriger Temperatur (25°C, 28°C) der aquatherm water bath shaker von New Brunswick mit Gegenkühlung verwendet. In regelmäßigen Zeitabständen werden Proben von 1 ml entnommen und in Reaktionsgefäßen in einer Mikro-Hämatokrit Zentrifuge (Heraeus-Christ) 3 min abzentrifugiert. Der Phagentiter wird auf E9 oder E74 bestimmt.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten die für die DNS-Replikation des Salmonella Phagen P22 essentiellen Wirtsfunktionen bestimmt werden. Eine einfache Möglichkeit die Notwendigkeit verschiedener Wirtsfunktionen für die Phagenreplikation zu prüfen, bieten sogenannte dna_{ts}-Mutanten der bakteriellen Wirte. Bei diesen Mutanten ist ein Protein, das an der DNS-Synthese beteiligt ist, so verändert, daß es temperatursensibel geworden ist; sie sind konditional letal. Bei niedriger Temperatur können sich solche Mutanten normal vermehren (permissive Temperatur). Bei hoher Temperatur (normalerweise 42°C) ist das Protein so geschädigt, daß es seine Funktion nicht mehr erfüllen kann und somit die DNS-Replikation aufhört (nichtpermissive Temperatur). dna_{ts}-Mutanten sind von Bazillus subtilis /42, 43, 44, 45, 46/, von E. coli /1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, 13, 15, 19, 49/ und Salmonella typhimurium /26, 27/ beschrieben. Weitaus die meisten solcher dna_{ts}-Mutanten sind von E. coli bekannt. Ein großer Teil von ihnen ist auch gut charakterisiert. Vom natürlichen Wirt des Phagen P22 - Salmonella typhimurium - stehen bis jetzt nur zwei dna_{ts}-Mutanten zur Verfügung. Sie kartieren an Stellen, die zu den entsprechenden E. coli dna-Genen analog sind. Vergleicht man die genetischen Karten von E. coli und S. typhimurium, die beide zur Familie der Enterobacteriaceae gehören, zeigt sich eine weitgehende Homologie /50, 51/. Diese Homologie geht sogar so weit, daß E. coli/S. typhimurium Hybride hergestellt werden können /30/. Daher sollte die große Vielzahl der E. coli dna_{ts}-Mutanten dazu benützt werden, um die Ab- bzw. Unabhängigkeit der DNS-Replikation des P22 von Wirtsgenen zu klären.
Bakteriophagen zeigen eine strenge Wirtsspezifität bezüglich der Adsorption des Phagenpartikels and der Zellwand. So ist auch der Salmonella Phage P22 nicht in der Lage an E. coli zu adsorbieren. Um trotzdem das vollständige P22 Genom in E. coli Zellen zu bringen, bestehen prinzipiell drei Möglichkeiten:

- mittels Transfektion
- Verwendung eines bakteriellen Zellwandhybrids
- F-Duktion mit einem F'-Faktor mit integriertem P22

Die Effizienz der Transfektion von E. coli mit reiner P22-DNS ist sehr gering. Sie beträgt nur 10^{-9} /28/ gegenüber 10^{-8} bei Transfektion von E. coli mit der DNS des E. coli Phagen λ /29/. Zum Großteil ist dies auf die Restriktion der P22-DNS in E. coli zurückzuführen, da die Modifikation von Salmonella nur gegen die zelleigene Restriktion schützt und die DNS daher in E. coli abgebaut wird. Wollte man diesen Effekt ausschalten, müßten von allen dna_{ts}-Mutanten restriktionsdefekte (r^-) Mutanten isoliert werden. Die Methode der Transfektion kam daher nicht in Betracht.
Gemski et al. /30/ isolierten ein S. typhimurium Hybrid, das auch λ die Adsorption erlaubt. Dieses Hybridbakterium wurde

durch eine Kreuzung zwischen Salmonella und einem E. coli Hfr-Stamm hergestellt. Hybride von E. coli dna_{ts}-Mutanten, an die P22 adsorbieren kann, könnten auf ähnliche Weise gemacht werden. Für jedes dieser Hybride müßte dann eine aufwendige genetische Analyse erfolgen, da sichergestellt werden muß, welcher DNS-Anteil ausgetauscht wurde und ob die dna_{ts}-Mutation erhalten blieb. Da für die geplante Untersuchung eine ganze Reihe von solchen Hybriden notwendig wäre, wurde auch diese Methode als zu aufwendig verworfen.
F-Duktion von E. coli nach Salmonella ist ebenso möglich wie in der umgekehrten Richtung /52, 53/. P22 kann in einer Salmonella Zelle in einen F'-Faktor - ein F-Episom mit einem Anteil an bakterieller DNS - integriert werden, wenn die P22-spezifische Integrationsstelle enthalten ist, um dann in E. coli übertragen zu werden. So kann auf relativ einfachem Weg P22 auf einem F'-Faktor als Vektor in die E. coli dna_{ts}-Mutanten transferiert werden.

3.1 Vermehrung des P22 in E. coli dna_{ts}-Mutanten

3.1.1 Herstellung P22-lysogener E. coli dna_{ts}-Mutanten

Die Integrationsstelle für den Phagen P22 (ataA) in das Salmonella Chromosom befindet sich rechts vom Genort proAB bei ca. 7 min /51, 54/. Auch auf dem E. coli Chromosom ist die Basensequenz, in die P22 integrieren kann, an der analogen Stelle vorhanden /31, 50/. Daher bot sich als Vektor für die Übertragung des P22 in E. coli mit Hilfe der F-Duktion ein E. coli F'lac^+-Episom /69/ an. In diesem Fall wurde ein F'lac-Episom verwendet, das einen bakteriellen Anteil mit den Genorten proAB bis einschließlich lac enthält. Damit ist die Integrationsstelle des P22 auf diesem Episom vorhanden. Befindet sich nun dieser F'pro^+lac^+-Faktor in einer Salmonella Mutante mit einer genügend großen Deletion im proAB-Bereich, so können lysogene Zellen nur entstehen, wenn sich P22 in den F'-Faktor integriert (Stamm S25).
Dieser F'pro^+lac^+-Faktor mit dem integrierten P22 sollte in mehrere E. coli dna_{ts}-Mutanten übertragen werden. Es war daher günstiger das Episom in einen geeigneten E. coli Spender zu transferieren: Zum einen verläuft die F-Duktion mit größerer Effizienz, wenn Spender und Empfänger dem selben Genus angehören. Außerdem muß sichergestellt sein, daß nur der F'-Faktor übertragen wird. F'-Faktoren können aber leicht in das bakterielle Chromosom integrieren, die Bakterien in den Hfr-Zustand übergehen /70, 71/ und so chromosomale DNS übertragen. Dies läßt sich verhindern, wenn als F'-Träger ein Stamm mit einer recA-Mutation verwendet wird. In solchen Stämmen läuft keine Rekombination mehr ab /55/, der F'-Faktor kann nicht integrieren, ist aber selber transferierbar /72/. Ein E. coli Stamm mit dieser Mutation, in den der F'pro^+lac^+ mit integriertem P22 (E64) aus dem Salmonella Stamm S25 übertragen worden war, stand im Labor zur Verfügung und wurde als Spender verwendet.
Der prinzipielle Versuchsablauf für die F-Duktion ist in

2.6.15 beschrieben. Hier soll nur auf die Selektionsmethode eingegangen werden. Ein Großteil der E. coli dna_{ts}-Mutanten, die uns zur Verfügung standen, waren lac^- und/oder pro^-. Zellen, die lac^- sind, können Lactose als Kohlenstoffquelle nicht verwerten und solche, die pro^- sind, müssen mit Prolin supplementiert werden, um in Minimalmedium wachsen zu können. Die meisten der Mutanten waren auch streptomycinresistent. Da der Spender E64 streptomycinsensibel war, bot sich so eine gute Selektionsmethode: Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gemisch aus Spender, Empfänger und Empfängerzellen, die den F'-Faktor erhalten hatten, auf M9lac-Platten mit Streptomycin plattiert. Alle für die Empfänger nötigen Zusätze außer Prolin waren in diesen M9lac-Platten supplementiert. Nur Empfängerzellen, die den $F'pro^+lac^+$-Faktor erhalten hatten, konnten auf diesen Platten wachsen.
So gelang es, den $F'pro^+lac^+$-Faktor in eine Reihe von E. coli dna_{ts}-Mutanten und ihre zugehörigen Wildtypstämme zu transferieren: in E1 (dna^+), E2 (dnaA46), E6 (dnaE486), E9 (dna^+), E10 (dnaB70), E20 (dna^+), E16 (dnaB43) und E21 (dnaG308).
Bei der F-Duktion mit E5 (Wildtyp zu E6) als Empfänger mußte die Selektionsmethode variiert werden, da dieser Stamm streptomycinsensibel ist. Die Spenderzellen konnten hier aber durch eine Aminosäureauxotrophie ausgeschaltet werden.
Die E. coli Stämme, die den F'-Faktor erhalten hatten, wurden dann auf die Anwesenheit des P22 getestet (siehe 2.6.3), weil der Phage bei der Konjugation durch abortive Induktion verloren gehen kann und daher nicht alle Empfängerzellen, die den F'-Faktor enthalten, auch lysogen sein müssen. Als Indikator wurde hier der Salmonella Stamm S3 verwendet, dessen Restriktionssystem defekt ist. Da der Phage hier von E. coli Zellen freigesetzt wird, stammt die Modifikation seiner DNS nicht von Salmonella, sondern von E. coli. Die DNS ist also nicht mehr gegen den Abbau durch die Salmonella-spezifischen Restriktionsenzyme geschützt und würde in einem Wildtyp Stamm restringiert werden. In S3 dagegen ist die Restriktion defekt und die "falsch" modifizierte DNS überlebt.
Stämme, die den F'-Faktor erhalten hatten und auch den Phagen P22 freisetzten, wurden isoliert. Der Stamm $E21/F'pro^+lac^+$(P22) mußte ständig unter Bedingungen vermehrt werden, die auf die Anwesenheit des F'lac selektierten, da das Episom sonst sehr schnell verloren ging - nach einer Passage in Vollmedium waren nur noch 19% der Zellen lysogen und fähig auf Lactose zu wachsen. In den übrigen Stämmen war der F'-Faktor stabil.

3.1.2 UV-Induktion des P22 in E. coli

Der Phage P22 lag nun in verschiedenen E. coli dna_{ts}-Mutanten in lysogener Form vor. Um eine mögliche Vermehrung des Phagen in den Mutanten bei nichtpermissiver Temperatur testen zu können, mußte er mit Hilfe von UV-Licht zum lytischen Wachstum induziert werden.
In der Regel beträgt die nichtpermissive Temperatur für dna_{ts}-Mutanten 42°C. Bei dieser Temperatur können aber aus

folgenden Gründen von P22 nach einer Induktion keine infektiösen Partikel gebildet werden:

(a) Ein früher Schritt nach der Induktion dieses Phagen ist hitzesensibel /32/. Eventuell ist das int-Genprodukt, das für die Exzision des Phagen aus der bakteriellen DNS benötigt wird, bei hoher Temperatur labil.

(b) Das self assembly der Phagenköpfe mit den base plates läuft bei hoher Temperatur nicht ab /32/.

(c) Das Gleichgewicht zwischen der Menge der produzierten Phagenköpfe und den base plates ist nach einer Induktion gestört. Je höher die Temperatur, umso mehr Köpfe als Schwanzpartikel (base plates) werden gebildet /32/.

Vorversuche ergaben, daß sich der Phage bei 38°C nach der Induktion ausreichend gut vermehrt. Der self assembly Schritt (b) kann ablaufen, wenn am Ende der Phagenvermehrung das Lysat 10 min bei 28°C inkubiert wird. Trotzdem muß die die Überproduktion an Köpfen (c) noch durch die Zugabe von konzentrierten Schwanzpartikeln (siehe 2.6.8) kompensiert werden.
Da so die Temperatur für die folgenden Versuche auf 38°C festgelegt war, mußte geprüft werden, ob die betreffenden dna_{ts}-Mutanten bereits bei dieser Temperatur hitzesensibel waren. Als grober Test dafür kann das Unvermögen der Zellen, bei 38°C Kolonien zu bilden, betrachtet werden. Keiner der fünf Stämme wuchs bei dieser Temperatur. 38°C wurde daher als nichtpermissive Temperatur für die folgenden Versuche gewählt und die Fähigkeit des P22, sich bei dieser Temperatur in verschiedenen dna_{ts}-Mutanten zu vermehren, geprüft.
Die Effektivität der UV-Induktion des Phagen ist stark abhängig von der UV-Dosis, mit der die Zellen bestrahlt werden. Ist sie zu hoch, überwiegt die abtötende Wirkung. Daher mußte für jedes Stammpaar (Mutante und Wildtyp) die optimale UV-Dosis für die Induktion bei permissiver Temperatur ermittelt werden. Der prinzipielle Versuchsablauf ist in 2.6.16 beschrieben. Für die Bestimmung der optimalen UV-Dosis wurden Proben mit steigenden UV-Dosen bestrahlt. Von jeder Probe wurde nach der Bestrahlung und vor der folgenden Inkubation die Lebendkeimzahl (LKZ) bestimmt, um durch die Abnahme des Titers die Abtötung der Bakterien verfolgen zu können. Nach der Inkubation bei 28°C wurde der Phagentiter ermittelt. Da sich die Phagen in E. coli Zellen vermehrt haben, wurde auch hier wieder der Salmonella Stamm S3 (restriktionsdefekt) als Indikator verwendet. Abb.1 zeigt eine so ermittelte Optimumkurve. Die UV-Dosis, mit der der höchste Phagentiter erzielt wurde, wurde für die weiteren Versuche mit dem jeweiligen Stamm verwendet. Bei allen Stammpaaren war die optimale UV-Dosis für die Mutante und den Wildtyp gleich. Sie betrug 20 J/m^2 für E1, E2, E5 und E6 und 40 J/m^2 für E9, E10, E16, E20 und E21.
Mit diesen Dosen wurde P22 induziert und dann das Wachstum in den dna_{ts}-Mutanten bei nichtpermissiver Temperatur geprüft. Der schematische Versuchsablauf ist in Abb.2 darge-

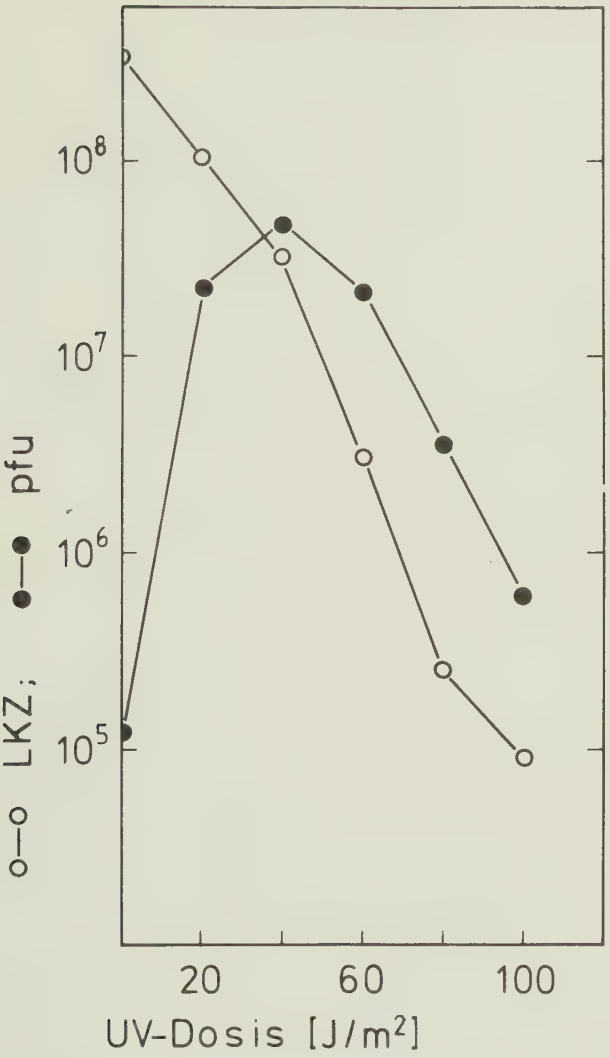

Abb.1: Optimumkurve für die UV-Bestrahlung von E10/F'(P22). Aufgetragen sind der Bakterientiter (o——o) und der Titer des Phagen P22 (●——●) nach der Bestrahlung mit verschiedenen Dosen UV-Licht.

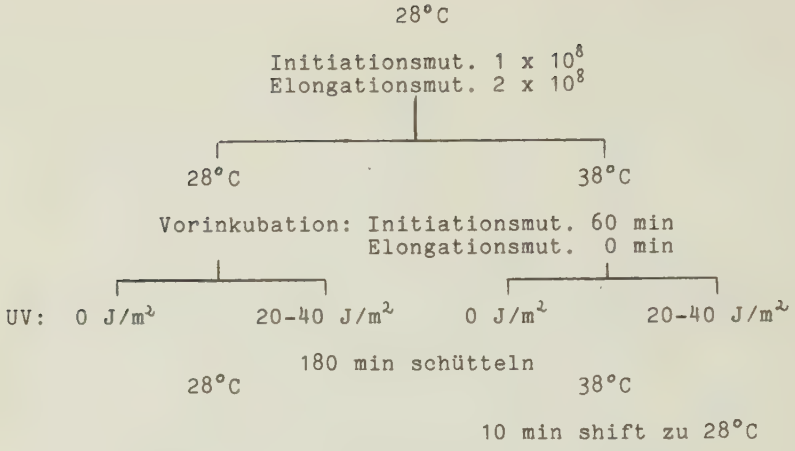

Abb.2: Fließschema für die UV-Induktion von P22 in E. coli dna_{ts}-Mutanten.

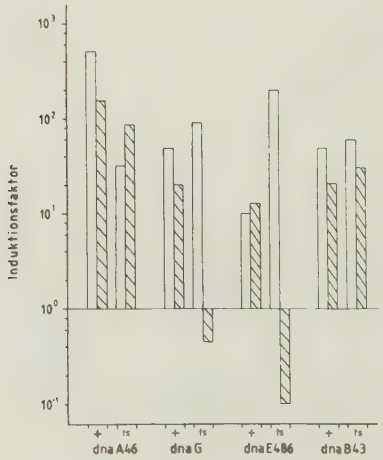

Abb.3: Vergleich der P22 Phagenproduktion nach UV-Induktion in E. coli dna_{ts}-Mutanten und den zugehörigen Wildtypen. Die Induktionsfaktoren bei 28°C (□) und 38°C (▨) sind aufgetragen. Ist der Faktor > 0, hat Phagenvermehrung stattgefunden, ist er ⩽ 0 hat sich der Phage nicht vermehrt.

stellt. Die P22-lysogene dna_{ts}-Mutante und der zugehörige Wildtyp wurden zunächst bei permissiver Temperatur gezogen. Handelte es sich um eine Initiationsmutante wurden die Kulturen geteilt und jeweils eine Hälfte 1 Stunde bei 38°C vorinkubiert. Nach diesem Zeitraum sind alle angefangenen Replikationsrunden beendet und neue können aufgrund des Initiationsdefektes nicht gestartet werden. Wurden Mutanten verwendet, bei denen die DNS-Synthese sofort nach dem Temperaturshift aufhört, mußte nicht vorinkubiert werden. Vor der Bestrahlung wurden die Kulturen nochmals geteilt, je eine Probe wurde bestrahlt, die andere nicht. Nach der Bestrahlung wurde von jedem Stamm eine bestrahlte und eine unbestrahlte Probe bei 28°C und bei 38°C inkubiert.
Die Phagenvermehrung bei permissiver Temperatur (28°C) diente als Kontrolle für das Experiment. Sie zeigt, ob die Induktion stattgefunden hat und der Phage sich in diesem Stamm vermehrt. Der Phagentiter der jeweiligen unbestrahlten Probe diente als Nullwert; er stellt die Phagenmenge dar, die ohne den Einfluß des UV-Lichts in diesem Zeitraum freigesetzt wurde. Das Verhältnis des induzierten Phagentiters zum Nullwert ergibt den "Induktionsfaktor" als Maß für die Phagenvermehrung. Konnte sich der Phage in dem betreffenden Wirt bei 38°C vermehren, so ist dieser Induktionsfaktor > 0. Ist er $\leqslant 0$, wurden keine Phagen gebildet; das geschädigte Wirtsprotein wird auch bei der DNS-Replikation des Phagen gebraucht. Die Induktionsfaktoren, die in den geprüften dna_{ts}-Mutanten und den dazu gehörenden Wildtypen bei 28°C und 38 C ermittelt wurden, sind in Abb.3 aufgetragen. In der Initiationsmutante E2 (dnaA46) vermehrte sich der Phage bei 28°C und bei 38°C. In den beiden Elongationsmutanten E6 (dnaE486) und E21 (dnaG308) dagegen wuchs der Phage bei 38°C nicht. In der Elongationsmutante E16 (dnaB43) jedoch wurden bei 38°C Phagenpartikel gebildet.
Der Salmonella Phage P22 und der E. coli Phage λ werden trotz ihrer unterschiedlichen Wirtsspezifität als nahe verwandt betrachtet /35/. Im Bereich rechts neben der jeweiligen Attachment-Stelle sind die DNS-Sequenzen beider Phagen weitgehend homolog /77/. Hybride zwischen P22 und λ sind lebensfähig /30, 36/ und die Anordnung funktionell entsprechender Genprodukte auf dem Chromosom ist gleichartig (siehe auch Abb.7, S.32). Die C-Immunität der beiden Phagen arbeitet nach dem gleichen Prinzip. Vor allem im Bereich der frühen Gene entsprechen sich sogar die Reihenfolge der einzelnen Gene sowie die Funktion ihrer Produkte. Deshalb war es naheliegend, die Bedürfnisse der DNS-Replikation des Phagen P22 an dna-Genprodukten des Wirts mit denen des Phagen λ zu vergleichen.
λ braucht aktive Produkte der Gene dnaB, dnaG und dnaE, nicht jedoch von dnaA, um sich replizieren zu können (siehe Tab.1, S.3). Nach den Ergebnissen der UV-Induktion gleicht P22 dem Phagen λ in Bezug auf die Unabhängigkeit von dnaA (E2) und die Abhängigkeit von intakten Proteinen der Gene dnaE (E6) und dnaG (E21). In der $dnaB_{ts}$-Mutante E16 vermehrt sich P22 aber, obwohl er manchmal als "lambdoider" Phage bezeichnet wird und λ abhängig von einem intakten dnaB-Genprodukt des Wirtes ist. Es war daher unbedingt erforderlich zu

prüfen, ob tatsächlich eine aktive dnaB-Funktion des Wirtes für die DNS-Replikation des P22 nicht notwendig ist.
Eine zweite $dnaB_{ts}$-Mutante (E10) und ihr zugehöriger Wildtyp (E9) waren mit P22 über die F-Duktion lysogenisiert worden. In diesen Stämmen wurde P22 nun auch mit UV-Licht induziert und die Induktionsfaktoren errechnet. Sie betrugen für den Wiltyp E9 1.7×10^3 bei 28°C und 1.8×10^2 bei 38°C, für die Mutante E10 7.1×10^2 bei 28°C und 22 bei 38°C. Auch in E10 (dnaB70) konnte der Phage also bei 38°C replizieren. Nun war natürlich zu berücksichtigen, daß diese Versuche bei 38°C durchgeführt worden waren.

3.1.3 Pulsmarkierung der bakteriellen DNS

Die nichtpermissive Temperatur, also die Temperatur bei der das betroffene Genprodukt so geschädigt ist, daß die bakterielle DNS-Synthese zum Erliegen kommt, ist bei beiden $dnaB_{ts}$-Stämmen (E10 und E16) 42°C. Bei Verwendung der intermediären Temperatur 38°C wurden von diesen Stämmen zwar auf Platten keine Kolonien mehr gebildet. Dies schließt aber nicht aus, daß das betroffene Protein noch eine geringe Aktivität besitzt, also noch etwas bakterielle DNS synthetisiert wird, jedoch keine weiteren Zellteilungen stattfinden. Die Vermehrung des Phagen P22 in den $dnaB_{ts}$-Mutanten bei 38°C könnte dann nicht durch eine Unabhängigkeit von diesem Genprodukt bedingt sein, sondern wäre auf die Nutzung dieser restlichen Aktivität des $dnaB_{ts}$-Proteins zurückzuführen. Diese Möglichkeit läßt sich mit Hilfe der Pulsmarkierung (siehe 2.6.2) der bakteriellen DNS prüfen.
Im Gegensatz zur akkumulierenden Messung kann mit dieser Methode genau verfolgt werden, wieviel DNS zu einem bestimmten Zeitpunkt synthetisiert wird. Bei einer akkumulierenden Messung wird das radioaktiv markierte Thymidin über die ganze Versuchsdauer hinweg angeboten. So kann nur die Gesamtzunahme an markierter DNS innerhalb eines bestimmten Zeitraums beobachtet werden. Kurzfristige Schwankungen werden nicht erfaßt. Bei der Pulsmarkierung dagegen wird das markierte Thymidin nur kurze Zeit angeboten (hier 2 min) und dann sofort die in das säurefällbare Material inkorporierte Radioaktivität bestimmt. Dadurch kann die tatsächliche DNS-Syntheseaktivität zu jedem beliebigen Zeitpunkt bestimmt werden. Schwankungen werden so genau registriert.
Bei diesem Versuch wurde Thymidin verwendet, weil es von den Zellen sehr schnell aufgenommen wird. Beide Stämme, die markiert werden sollten, sind thy^--Mutanten. In solchen Mutanten ist die zelluläre Konzentration an Desoxythymidintriphosphat sehr niedrig, die an Desoxyuridinmonophosphat und Desoxyribose-1-phosphat sehr hoch. Dies sind die idealen Bedingungen für den Einbau von angebotenem Thymin bzw. Thymidin in die DNS. Unter diesen Voraussetzungen ist die Thymidinkinase, die Thymidin in Thymidinmonophosphat umwandelt, äußerst aktiv. Daher spielt der Abbau des Nukleosids durch die induzierbare Thymidinphosphorylase, wie er in thy^+-Zellen stattfindet, in thy^--Mutanten keine Rolle. Durch die geringe Konzentration an endogenem Desoxythymidintriphosphat in thy^--Zellen wird auch bei einem Shift zu höheren Tempera-

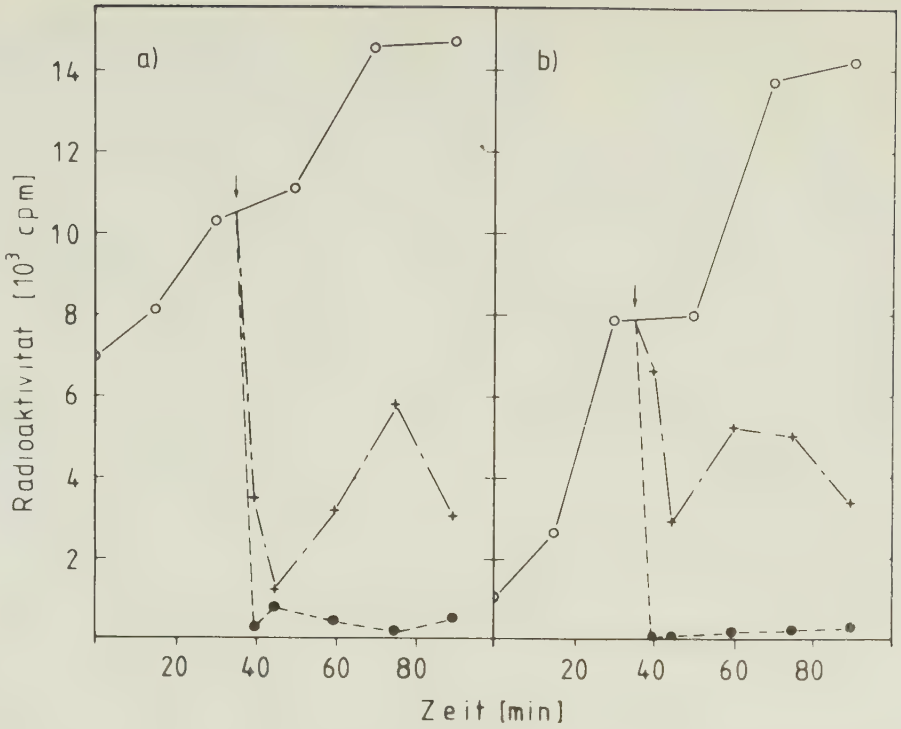

Abb.4: Pulsmarkierung der DNS in E10 (a) und E16 (b) mit ^{3}H-Thymidin. Aufgetragen ist die in 2 min Pulsen in die DNS inkorporierte Radioaktivität (cpm) bei 28°C (o——o), 38°C (+— - —+) und 42°C (●- - -●). Der Zeitpunkt des Temperaturshifts ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

turen die Vortäuschung gesteigerter DNS-Syntheseaktivitäten durch eine bessere Aufnahme des Thymidins in die Zelle vermieden. Eine gute Zusammenfassung aller Aspekte des Thymidinstoffwechsels und der Markierung der DNS ist in /160/ zufinden.
Die Pulsmarkierung wurde mit E10 und E16 durchgeführt. Die Stämme wurden bei permissiver Temperatur (28°C) bis zu einer OD(560) von 0.12 belüftet. Der Zelltiter betrug dann ca. 5 x 10^7/ml und die Zellen befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase. In diesem Stadium wurde mit der Pulsmarkierung begonnen. Bei einer OD(560) von 0.15 (Zelltiter ca. 7 x 10^7/ml) wurden die Kulturen jeweils in drei Teile geteilt. Ein Teil wurde weiter bei 28°C belüftet, einer wurde nun bei 38°C und der andere bei 42°C weiter inkubiert. Kurz nach diesem Shift zu höheren Temperaturen wurden Proben entnommen und markiert. Bei allen drei Temperaturen wurde weiter in Zeitabständen der Einbau von radioaktivem Thymidin gemessen. Zur Kontrolle wurde die Radioaktivität bestimmt, die unspezifisch an den Filtern adsorbiert, wenn sofort nach Zugabe der Zellen zum Markierungsmedium mit TCA gestoppt wird, die Probe sonst aber wie die anderen behandelt wird.
Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb.4 dargestellt. Bei beiden Stämmen nimmt bei der permissiven Temperatur 28°C der Einbau von ^{3}H-Thymidin mit der Vermehrung der Zellmasse langsam zu. Beim Shift zu 42°C sollte das dnaB-Protein beider Stämme sofort in den defekten Zustand übergehen und die DNS-Synthese schnell abgeschaltet werden, da E10 und E16 als Elongationsmutanten charakterisiert sind /19, 33/. Dies bestätigte sich in diesem Experiment: 5 min nach dem Temperaturshift wurde bei E10 nur noch 2.2% der Menge an ^{3}H-Thymidin eingebaut, die zum gleichen Zeitpunkt bei permissiver Temperatur inkorporiert wurde, bei E16 nur 0.9%. Die DNS-Syntheserate bei 42°C blieb die ganze Dauer des Versuchs sehr niedrig (60 min nach Shift E10: 3.7%, E16: 2.1%). Bei der intermediären Temperatur 38°C wurde der Einbau von ^{3}H-Thymidin auch drastisch reduziert - 10 min nach Shift betrug er bei E10 11.0% relativ zum Einbau bei 28°C und 37.2% bei E16. Dann stieg die DNS-Syntheseaktivität aber wieder an auf 40.1% bei E10 40 min nach Shift und bei E16 auf 48.7% 25 min nach Shift. Die Einbaurate sank dann wieder ab und betrug 60 min nach Shift 20.8% bei E10 und 24.0% bei E16, bezogen auf den Einbau bei 28°C zum gleichen Zeitpunkt. Die Fähigkeit beider dnaB-Genprodukte ihre Aufgabe bei der DNS-Synthese zu erfüllen, ist also bei 38°C zwar reduziert, die restliche Aktivität könnte aber genügen, um die DNS-Replikation des Phagen zu ermöglichen.

3.1.4 UV-Induktion des Phagen λ in E10 und E16

Falls eine DNS-Syntheseaktivität von ca. 50% bei 38°C gegenüber der bei permissiver Temperatur in den $dnaB_{ts}$-Mutanten E10 und E16 für die Vermehrung des P22 verantwortlich war, so sollte auch der E. coli Phage λ, der ein aktives dnaB-Protein für seine DNS-Replikation braucht (siehe Tab.1, S.3), ebenfalls bei dieser Temperatur, zumindest bedingt, in beiden Mutanten wachsen können. Um dies unter den gleichen

Stamm	Exp	UV-Dosis	Temperatur		
		[J/m²]	28°C	38°C	42°C
E10(λ)/F'	(1)	0	6.4×10^4	2.0×10^3	2.3×10^2
		40	1.0×10^9	2.6×10^5	1.6×10^2
	(2)	0	1.3×10^3	4.6×10^3	2.8×10^2
		40	1.8×10^8	1.1×10^4	5.6×10^2
E16(λ)/F'	(1)	0	1.0×10^5	3.2×10^3	4.1×10^2
		40	1.5×10^7	2.3×10^3	2.1×10^2
	(2)	0	2.6×10^4	9.3×10^3	8.2×10^2
		40	2.3×10^6	3.3×10^5	2.3×10^2

Tab.4: Phagenproduktion des E. coli Phagen λ in zwei $dnaB_{ts}$-Mutanten bei verschiedenen Temperaturen nach der UV-Induktion.

Voraussetzungen wie bei P22 zu testen, wurden beide Stämme mit dem F'pro⁺lac⁺Faktor versehen. Als Spender für diese Kreuzungen diente der Stamm E68. Dieser Stamm enthält den F'pro⁺lac⁺-Faktor ohne ein integriertes P22 Genom, sonst ist er identisch mit E64. Die Selektionsmethode war daher die gleiche wie in 3.1.1. Dann wurden E10/F' und E16/F' mit λ lysogenisiert (siehe 2.6.3). In diesen beiden Stämmen wurde der Phage λ dann genauso wie zuvor P22 mit UV-Licht induziert (siehe 3.1.2), anschließend bei 28°C, 38°C und 42°C inkubiert und die Phagentiter ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab.4 zusammengefaßt.
Bei 28°C wurde λ gut induziert. Bei 42°C wurden keine Phagen gebildet. In E10(λ)/F' vermehrte sich λ bei 38°C. In E16(λ)/F' dagegen wurden in zwei unabhängigen Experimenten einmal Phagen gebildet und einmal nicht. Diese intermediäre Temperatur scheint also ein Schwellenwert für die Inaktivierung des dnaB-Genprodukts zu sein, so daß bereits geringe Temperaturunterschiede die Bedingungen für die Replikation der Phagen-DNS ändern. Die Befunde lassen daher immer noch keine Entscheidung darüber zu, ob die DNS-Replikation des Salmonella Phagen P22 tatsächlich vom E. coli dnaB-Genprodukt unabhängig ist, oder ob dies nur bei der intermediären Temperatur 38°C vorgetäuscht wird. Für eine eindeutige Aussage mußten Bedingungen gefunden werden, die die Vermehrung des P22 bei 42°C zulassen.

3.2 Versuche mit einem λ/P22-Hybrid

Alle Schwierigkeiten, die im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurden, sind auf das Verhalten des P22 nach Induktion zurückzuführen. Es mußte also eine Möglichkeit gefunden werden, das Wachstum des P22 in E. coli dna_{ts}-Mutanten bei nichtpermissiver Temperatur nach einer Infektion zu testen. Außer dem self assembly der Phagenköpfe mit den Schwanzpartikeln (kompensierbar wie in 3.1.2) läuft dann die Phagenvermehrung auch bei 42°C normal ab /34/.
Für die DNS-Replikation des P22 sind die frühen Gene 24, 18 und 12, sowie der P22-spezifische origin essentiell. Das Genprodukt 24 hat regulatorische Funktionen, analog dem Genprodukt N von λ/73/, die Genprodukte 18 und 12 sind direkt an der DNS-Synthese beteiligt und analog zu den Genprodukten O und P von λ/74, 75, 76/. Ein Phagenhybrid mit dieser Replikationsregion von P22 (repP22) hätte eine P22-spezifische DNS-Replikation. Stammen die späten Gene eines solchen Hybrids, also die Gene, die für morphogenetische Proteine und Hüllkomponenten des Phagenpartikels codieren, von einem E. coli Phagen, würde es E. coli Wirte normal infizieren können.
Salmonella Phage P22 und E. coli Phage λ werden wie bereits erwähnt als verwandt betrachtet /35/. Aufgrund homologer DNS-Sequenzen /77/ können beide Phagen miteinander rekombinieren. Sie bilden lebensfähige Hybride /30, 36/ mit der Proteinhülle - und damit der Wirtsspezifität - von λ und einem unterschiedlich großen Anteil im Bereich der Immunitäts- und Replikationsregion von P22. Mit Hilfe eines solchen Hybrids läuft eine von P22 Genen gesteuerte DNS-Replikation in E. coli bei 42°C nach einer normalen Infektion ab.

3.2.1 P22Hy200 - ein λimmP22repP22-Hybrid

Um ein λ/P22-Hybrid zu konstruieren, müssen die Phagen gekreuzt werden und Selektionsmöglichkeiten für das gesuchte Hybrid gegeben sein. Beide Elternphagen müssen sich gleichzeitig in einer Zelle vermehren. Durch die vorausgegangenen Experimente waren verschiedene E. coli Stämme, die den P22 enthalten, vorhanden. Einer von ihnen, E9/F'pro^+lac^+(P22), wurde als Ausgangsstamm für die Kreuzung gewählt. Der Phage P22 wurde durch UV-Bestrahlung induziert (siehe 2.6.16) und zu verschiedenen Zeitpunkten mit λc^- mit einer moi von 5 nachinfiziert. Nach 150 min bei 28°C unter Schütteln wurde die Inkubation beendet. Eine Nachinfektion 30 min nach der UV-Induktion des P22 erwies sich am günstigsten, hier entstanden die meisten Hybridphagen. Das Lysat wurde dann auf verschiedenen Indikatoren titriert, um die entstandenen Phagen klassifizieren zu können.
Die Plattierungscharakteristika für die verschiedenen Phagentypen, die bei der Kreuzung entstehen können, sind in Tab.5 zusammengefaßt. Hybride mit P22 Hülle und der Replikationsregion von λ werden nicht erfaßt, da das Genprodukt N von λ nur in Bakterien aktiv sein kann, die genotypisch nus^+

	S3	E74	E74(λ)	E9/ F'(P22)	E39 groPB585	E24 dnaK756	Plaque-morphol.
P22	+	-	-	-	-	-	trüb
λc⁻	-	+	-	+	-	-	klar
λimmP22repλ	-	+	+	-	-	-	trüb
λimmP22repP22	-	+	+	-	+	+	trüb
λimmλrepP22	-	+	-	+	+	+	klar

Tab.5: Plattierungseigenschaften der Elternphagen und der Phagenhybride mit λ Hülle, die bei der Kreuzung von λ und P22 entstehen können.

sind, Salmonella ist aber nus⁻ (nus⁻ für N undersupplied) /79, 81/. In E74 vermehren sich λ und alle Hybride mit λ Hülle, im Salmonella Stamm S3 nur P22. In E74(λ) können nur Hybride mit λ Hülle und P22 Immunität (immP22), also λimmP22repλ und λimmP22repP22, wachsen. Der Repressor, der in diesem λ-lysogenen E. coli Stamm gebildet wird, hindert alle infizierenden Phagen mit der Immunität von λ - λ und λimmλrepP22 - an der lytischen Vermehrung. Eine zusätzliche Kontrolle bot die Plaquemorphologie: Aufgrund der genetischen Beschaffenheit der Elternphagen müssen alle entstandenen Phagen mit der Immunität von P22 trübe Plaques bilden, alle mit immλ klare. Hybridphagen, die auf E74(λ) plattierten, wurden isoliert.
Diese Phagen sind zwar mit Sicherheit vom Typ λimmP22, es ist jedoch noch nicht charakterisiert von welchem Elternphagen die Replikationsregion stammt. Dies kann aber leicht geprüft werden: λ-WT (wobei das intakte Genprodukt P entscheidend ist) wächst nicht in E. coli Stämmen mit einer groP- oder einer dnaK-Mutation, auch dann nicht, wenn die Temperatur für das Bakterium permissiv ist /14, 16, 78/. Ein Hybrid, bei dem das λ Gen P gegen P22 Gen 12 ausgetauscht ist, vermehrt sich aber in einer solchen Mutante /36/. Daher müssen Phagen, die auf den Stämmen E39 (groPB585) und E24 (dnaK756) wachsen Gen 12 von P22 haben und damit auch Gen 18, da nur Hybride, bei denen beide Genen als Einheit ausgetauscht werden, lebensfähig sind /37/. Der Hybridphage P22Hy180, der so isoliert wurde, muß also die C-Immunität bis einschließlich Gen 12 von P22 enthalten. Von diesem Hybridphagen wurde eine spontane Klarplaquemutante isoliert - P22Hy200.
Noch eine weitere Aussage über den Anteil an P22-DNS des Hybrids kann gemacht werden: Gen N bzw. 24, dessen Produkt für die Exprimierung der anderen Gene essentiell ist, liegt

links von c_2 (c_I bei λ), dem Repressorgen (siehe Abb.7, S.32). Ein Austausch in diesem Bereich ist in P22Hy200 daher nicht direkt nachgewiesen. Aber auch dieses regulatorische Genprodukt muß in diesem λimmP22repP22-Hybrid von P22 sein: Das Genprodukt N von λ wirkt als Antiterminator bei der Transkription /80/, es kann diese Funktion aber nicht bei Terminatoren von P22 ausüben /37/. (Das analoge P22 Genprodukt 24 ist nicht so spezifisch, es ist auch bei λ Terminatoren aktiv.) In der Region, die bei dem Hybrid mit Sicherheit ausgetauscht ist, liegt mindestens ein Terminator, t_{R1}. Dieser ist also P22-spezifisch und das Genprodukt N von λ könnte seine Funktion nicht erfüllen, die Genprodukte 18 und 12 würden nicht exprimiert und ein solches Hybrid wäre überhaupt nicht lebensfähig.
P22Hy200, ein λimmP22repP22-Hybrid, muß also mindestens die Region von Gen 24 bis einschließlich 12 von P22 enthalten. Keine Aussage kann aber darüber gemacht werden, inwieweit der Bereich links von 24 gegen P22-DNS ausgetauscht ist. Diese Kartierung auf rein genetischer Basis sollte noch durch ein "physical mapping" unterstützt werden.

3.2.2 Kartierung von P22Hy200 mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme, die an spezifischen DNS-Basensequenzen schneiden, sind zu einem weit verbreiteten Werkzeug in der molekularen Biologie geworden. Diese Enzyme werden aus den verschiedensten Mikroorganismen isoliert /82/. Je nach Restriktionsenzym und Herkunft der DNS, die als Substrat verwendet wird, ergibt sich ein unverwechselbares Muster von Fragmenten.
Für diese Kartierung wurden zwei Restriktionsenzyme benützt: EcoRI aus E. coli RY13 erkennt die Sequenz 5'··GAATTC··3' und schneidet zwischen G und A /83/. HindIII aus Haemophilus influenzae R erkennt die Sequenz 5'··AAGCTT··3' und spaltet die DNS zwischen A-A /84/. Die Fragmente, die nach der Behandlung von λ- und P22-DNS mit EcoRI entstehen, sind den genetischen Karten der Phagen zugeordnet /38, 39/, ebenso sind die HindIII-Schnittstellen von λ und P22 kartiert /40, 41/. Aus diesem Grund wurden diese Restriktionsenzyme für das physical mapping des Hybrids gewählt. Die verschiedenen Arbeitsvorgänge sind in 2.6.10 bis 2.6.14 beschrieben. Bei einem Vergleich der Spaltprodukte der Elternphagen und P22 mit dem Hybrid kann abgeschätzt werden, wieviel DNS ausgetauscht wurde und in welchem Bereich dieser Austausch stattgefunden hat.
In Abb.5 ist das Bandenmuster der drei Phagen nach der EcoRI-Behandlung abgebildet. Ein Vergleich der Spalten a (λ) und b (P22Hy200) zeigt, daß drei Banden von λ, nämlich A, B und C, beim Hybrid ebenfalls zu finden sind. Die Fragmente D, E und F von λ fehlen beim Hybrid. Die Region der Schnittstellen 4 und 5 (siehe Abb.7) auf der λ-DNS muß also gegen P22-DNS ausgetauscht sein. Spalte b und c zeigt, daß keine P22-spezifische Bande beim Hybrid auftaucht. Das Fragment B des Hybrids ist keiner Bande der Elternphagen zu zuordnen. Es enthält den gesamten Bereich der ausgetauschten DNS. Da der EcoRI-Schnitt 4 auf der λ-DNS am linken Ende von Gen O

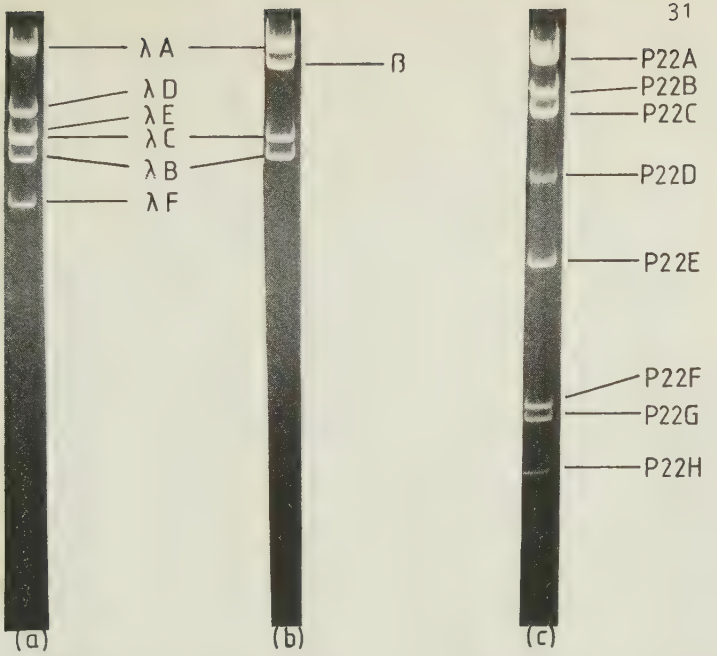

Abb.5: Bandenmuster der DNS von λc⁻ (a), P22Hy200 (b) und H5 (P22c⁻) (c) nach der Behandlung mit EcoRI und anschließender Elektrophorese.

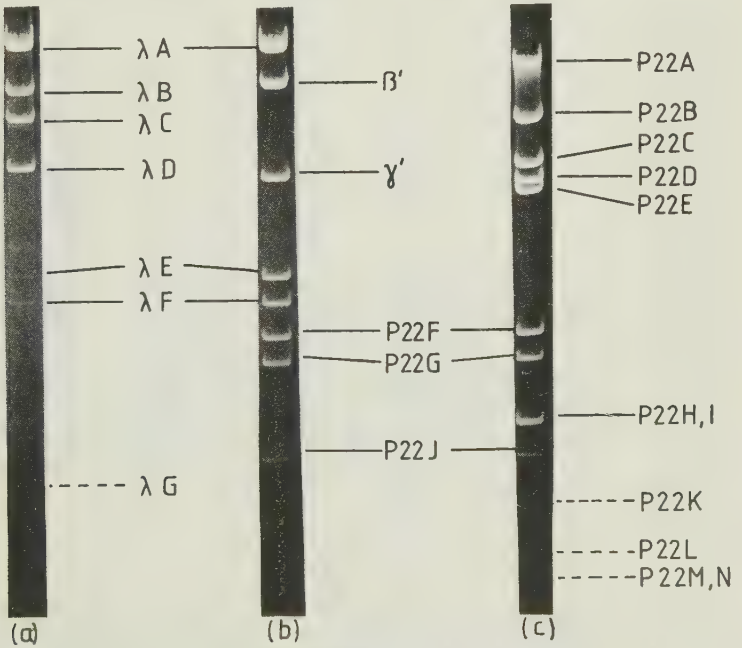

Abb.6: Bandenmuster der DNS von λc⁻ (a), P22Hy200 (b) und H5 (P22c⁻) (c) nach der Behandlung mit HindIII und anschließender Elektrophorese.

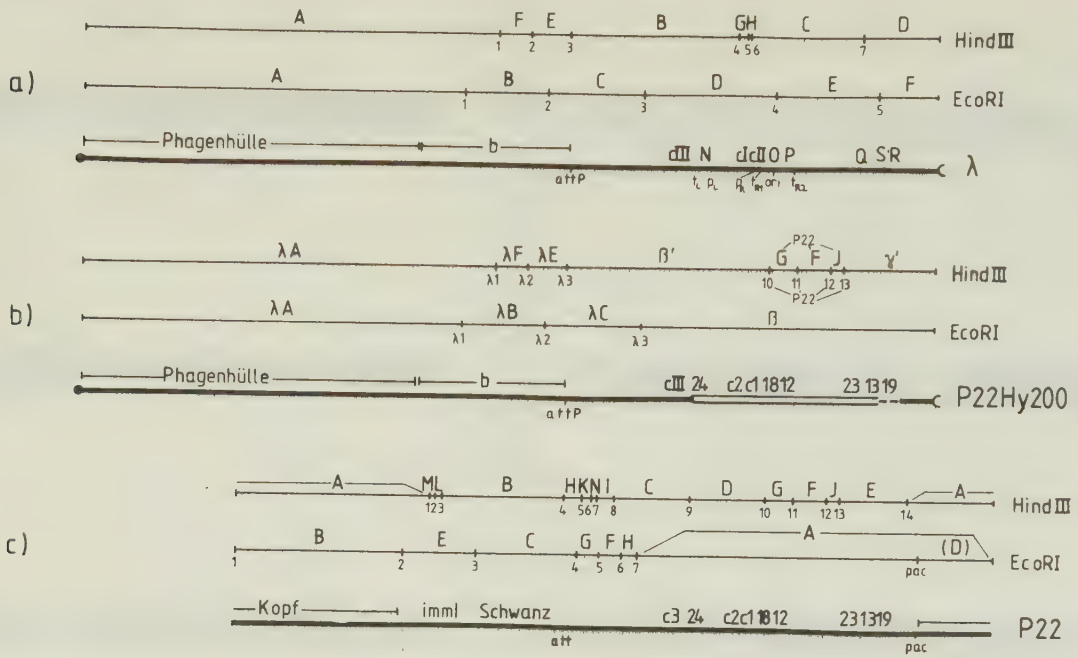

Abb.7: Vergleich der Restriktionskarten von a) λ /38, 40/, b) P22 /39, 41/ und c) P22Hy200. Die Kartenpositionen der λ Gene sind von Echols und Murialdo /85/ übernommen. Die Länge der P22-DNS ist normiert auf die Länge der λ-DNS. Die Karten sind an der jeweiligen Attachment-Stelle in Übereinstimmung gebracht.

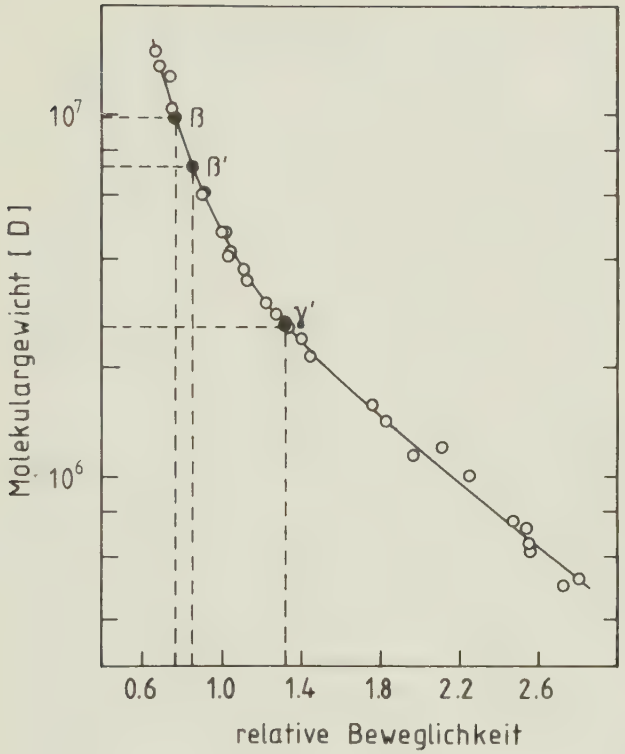

Abb.8: Molekulargewichtsbestimmung für die P22Hy200 Fragmente ß, ß' und γ'. Die relative Beweglichkeit der HindIII- und EcoRI-Fragmente von λ- und P22-DNS (normiert auf das EcoRI-Fragment λD) ist gegen ihr bekanntes Molekulargewicht aufgetragen. Anhand der relativen Beweglichkeit der P22Hy200 Fragmente ß, ß' und γ' kann deren ungefähres Molekulargewicht bestimmt werden.

liegt /88/ und Q auf dem Fragment E, läßt sich bisher nur sagen, daß im Hybrid der Bereich von λ O bis hinter λ Q (Gen 23 bei P22) gegen P22-DNS ausgetauscht ist. Die Begrenzung nach links läßt sich mit diesem Restriktionsenzym nicht festlegen. Dies ist erst bei Verwendung von HindIII möglich. Abb.6 stellt das Bandenmuster der drei Phagen nach der Behandlung mit HindIII dar. Wieder lassen sich einige Banden des Hybrids λ zuordnen: λA, λE und λF finden sich im Hybridmuster wieder. Diesmal finden sich auch P22-spezifische Banden beim Hybrid: P22F, P22G und P22J. Nur die Banden ß' und γ' entsprechen keinem Fragment der Elternphagen. Die Region der λ HindIII-Schnittstellen 4, 5, 6 und 7 ist also gegen P22-DNS ausgetauscht. Mindestens der Bereich rechts von Gen N bis einschließlich Q ist demnach durch P22-DNS ersetzt. In dieser Region liegen einige HindIII-Schnitte auf der P22-DNS. Da die Bruchstücke P22F, P22G und P22J identifizierbar sind, muß der Bereich der Schnitte 10, 11, 12 und 13 auf dem P22-DNS-Anteil vorhanden sein. Da das Fragment P22D fehlt, ist der Bereich der Schnittstelle 9 bereits wieder λ-DNS. Dies bedeutet, daß die Rekombination zwischen beiden Phagen kurz vor Gen 24 von P22 stattgefunden haben muß (Abb.7). Die Gene links davon stammen alle von λ. Ca. 20% des λ Genoms ist damit gegen P22-DNS ausgetauscht worden.
Bei solchen Hybridphagen kann der Anteil der substituierten DNS kleiner sein als der deletierte /39/. Um zu prüfen, ob dies auch für P22Hy200 zutrifft, wurde das Molekulargewicht der Fragmente ß, ß' und γ' abgeschätzt (Abb.8). Die bei den verwendeten Elektrophoresebedingungen resultierende relative Beweglichkeit von DNS-Fragmenten mit bekannten Molekulargewichten wurde in einer Kurve aufgetragen (EcoRI- und HindIII-Fragmente von λ und P22). Anhand der Laufstrecke der Fragmente ß, ß' und γ' kann so deren ungefähres Molekulargewicht bestimmt werden: 9.8×10^6 D für ß, 7.2×10^6 D bei ß' und 2.6×10^6 D für γ'. Summiert man nun die Molekulargewichte von P22Hy200 ergibt sich ein Wert von 30×10^6 D. Dies entspricht der in der Literatur angegebenen Größe $30.8 \pm 1.0 \times 10^6$ D für λ /86/. In P22Hy200 kann also, wenn überhaupt, nur eine sehr kleine Deletion stattgefunden haben.
Die Kartierung mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII hat damit die genetischen Befunde bestätigt und zusätzliche Information über den Anteil an P22-DNS in P22Hy200 ergeben: die Gene 24 bis einschließlich 23 von P22 sind enthalten.

3.2.3 Einstufenwachstumsexperimente mit P22Hy200

Mit P22Hy200 war es möglich, E. coli dna_{ts}-Mutanten lytisch zu infizieren. Eine P22-gesteuerte DNS-Replikation konnte daher ohne Komplikationen bei 42°C auf ihre Bedürfnisse an Wirtsgenprodukten hin getestet werden. Das einfachste Kriterium dafür, ob eine Phagen-DNS-Replikation stattgefunden hat oder nicht, ist die Vermehrung des Phagen. Am genauesten verfolgen läßt sich die Zunahme der Phagenpartikel in Einstufenwachstumsexperimenten (siehe 2.6.17).
Durch die Bestimmung der freien Phagen im Medium kann der zeitliche Ablauf der Phagenvermehrung beobachtet werden. Zuerst adsorbieren die Phagen an der Bakterienzellwand - der

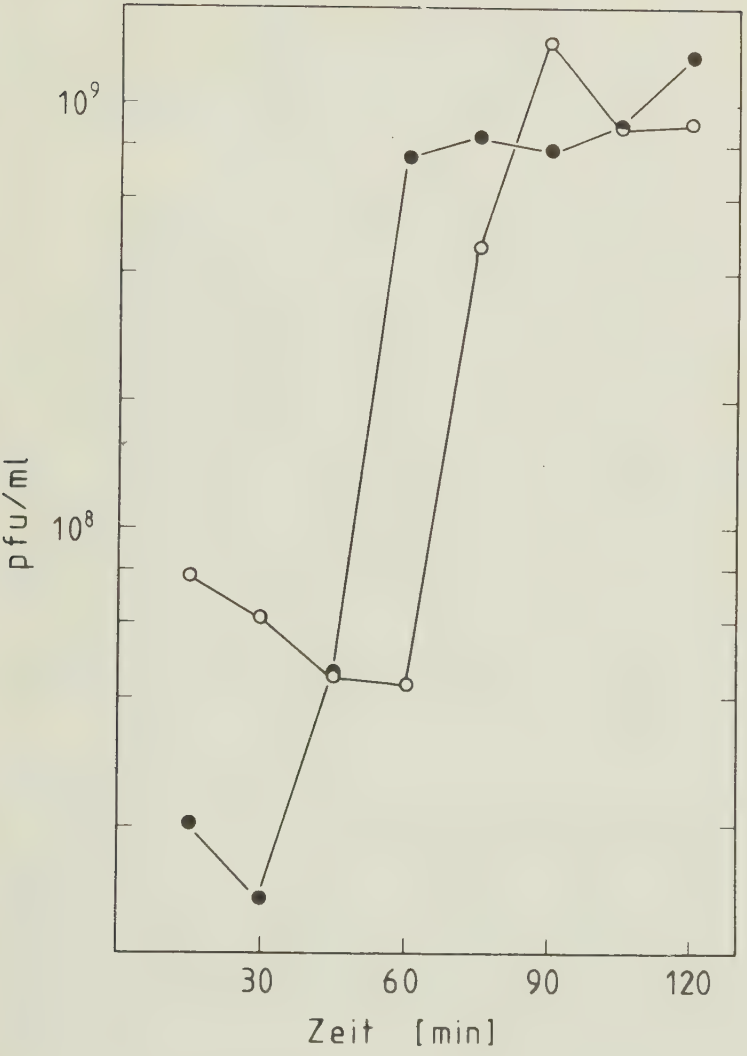

Abb.9: Einstufenwachstumsexperiment mit P22Hy200 in E20 (WT) bei 28°C (o-o) und 42°C (●-●).

Titer nimmt ab. Nimmt die Zahl der freien Phagen am Ende der Latenzperiode schlagartig zu, dann hat sich der Phage vermehrt, die DNS muß also repliziert worden sein. Kann keine DNS synthetisiert werden, entstehen keine neuen Phagen und der Titer der vorhandenen nimmt durch fortlaufende Adsorptionen weiter ab. Bei solchen Experimenten soll jede infizierte Zelle möglichst nur von einem Phagen infiziert werden, damit später die ungefähre mittlere Größe des Phagenwurfs abgeschätzt werden kann. Daher wurde in den beschriebenen Versuchen die Multiplizität nie höher als 1 angesetzt, in vielen Fällen sogar deutlich darunter. Daraus erklären sich auch die unterschiedlichen absoluten Werte der Kurvenpunkte.

Um den zeitlichen Verlauf des Vermehrungszyklus von P22Hy200 bei 28°C und 42°C zu kennen, wurde als erstes ein E. coli Wildtyp, E20, infiziert (Abb.9). Bei 28°C war der höchste Titer 90 min nach der Infektion erreicht, bei 42°C war bereits 60 min nach Infektion der erste Phagenwurf freigesetzt. Nach diesen Zeiten wurden die Probeentnahmen der weiteren Experimente festgelegt und Einstufenwachstumsexperimente mit P22Hy200 in den zur Verfügung stehenden λ-sensitiven (λ Hülle des Hybrids !) E. coli dna_{ts}-Mutanten durchgeführt. Die Vermehrung des Hybrids bei 28°C wurde jeweils zur Kontrolle mit verfolgt. In den Elongationsmutanten E6 (dnaE486) und E21 (dnaG308) vermehrte sich P22Hy200 nur bei permissiver Temperatur (28°C) (Abb.10). Der leichte Anstieg an freien Phagen bei E6 bei 42°C dürfte auf die relativ hohe Rückmutantenzahl (1.7×10^{-7}) dieses Stamms und auf die Leakiness der dnaE-Mutation zurückzuführen sein. Damit ist das Ergebnis der UV-Induktion mit diesen beiden Mutanten bestätigt. Das Verhalten in E2 (dnaA46) konnte nicht überprüft werden, da dieser Stamm λ-resistent ist. In einer anderen Initiations-defekten Mutante, E4 (dnaC325), vermehrte sich P22Hy200 auch bei 42°C, nicht jedoch in der Mutante E24 (dnaK756) (Abb.11). In der Elongationsmutante E22 (dnaZ2016) wurden bei nichtpermissiver Temperatur keine Phagennachkommen gebildet, ebensowenig im Ligase-defekten Stamm E48 (lig321) (Abb.12).

Bei den Einstufenwachstumsexperimenten von P22Hy200 in den beiden $dnaB_{ts}$-Mutanten E10 und E16 wurde auch die Vermehrung von λ bei 28°C und 42°C unter diesen Bedingungen getestet. Da λ ein aktives dnaB-Protein braucht, sollte er sich nur bei 28°C replizieren können und diente so als Kontrolle für den Ausfall der dnaB-Funktion. Die Ergebnisse sind in Abb.13 dargestellt. P22Hy200 vermehrte sich in beiden $dnaB_{ts}$-Mutanten bei 42°C, obwohl bei dieser Temperatur weder der Phage λ Nachkommen produzierte noch eine bakterielle DNS-Synthese stattfindet (siehe Abb.4, S.25). Dies zeigt, daß die Vermehrung des P22 bei 38°C nach der UV-Induktion nicht nur durch die Nutzung einer restlichen Aktivität des $dnaB_{ts}$-Proteins bedingt sein kann, sondern auch bei völlig abgeschalteter DNS-Synthese möglich ist.

Trotz der Verwandtschaft zwischen λ und P22 gerade im Bereich der frühen Gene muß ein entscheidender Unterschied in den Ansprüchen der DNS-Replikation beider Phagen an die Wirtsgenprodukte bestehen. Es sollte nun versucht werden, die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten bezüglich der bakteriellen dnaB-Funktion zu klären.

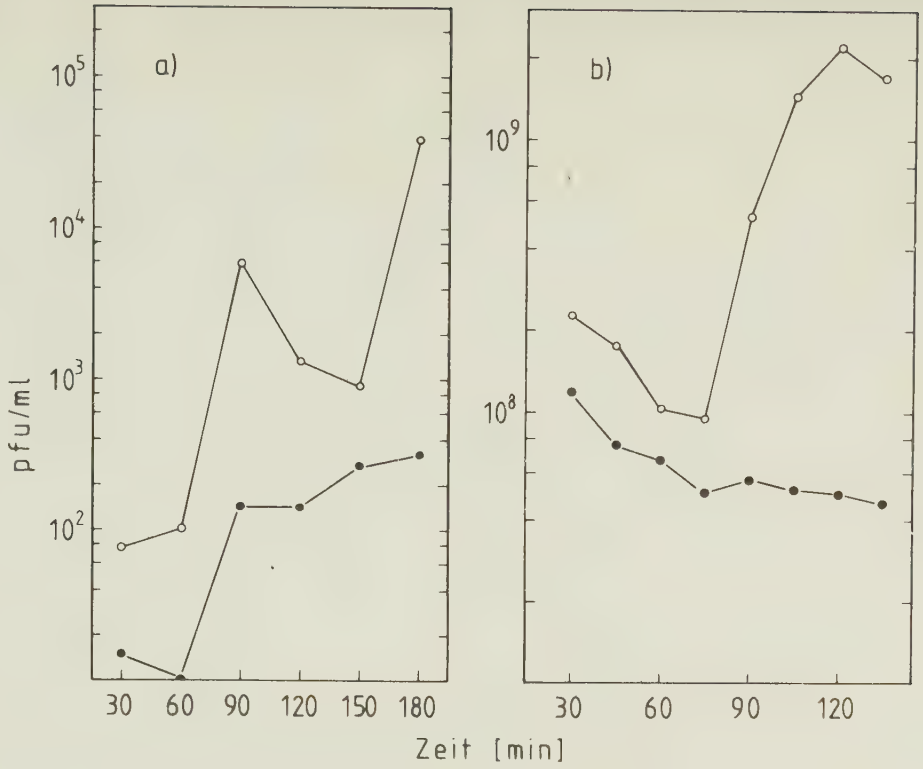

Abb.10: Einstufenwachstumskurve von P22Hy200 in a) E6 (dnaE486) und b) E21 (dnaG308) bei 28°C (o-o) und 42°C (•-•).

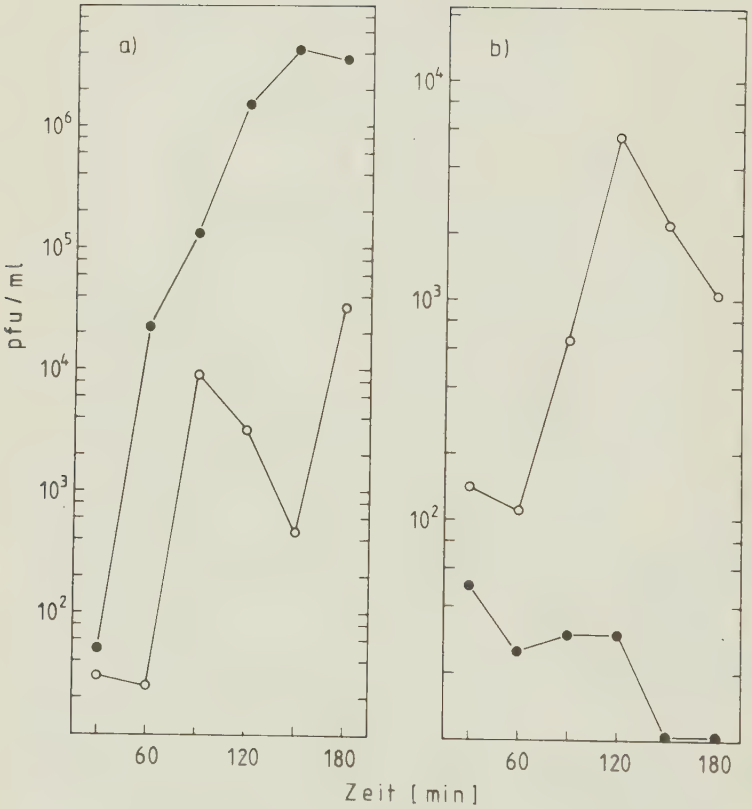

Abb.11: Einstufenwachstumskurve von P22Hy200 in a) E4 (dnaC325) und b) E24 (dnaK756) bei 28°C (o-o) und 42°C (●-●).

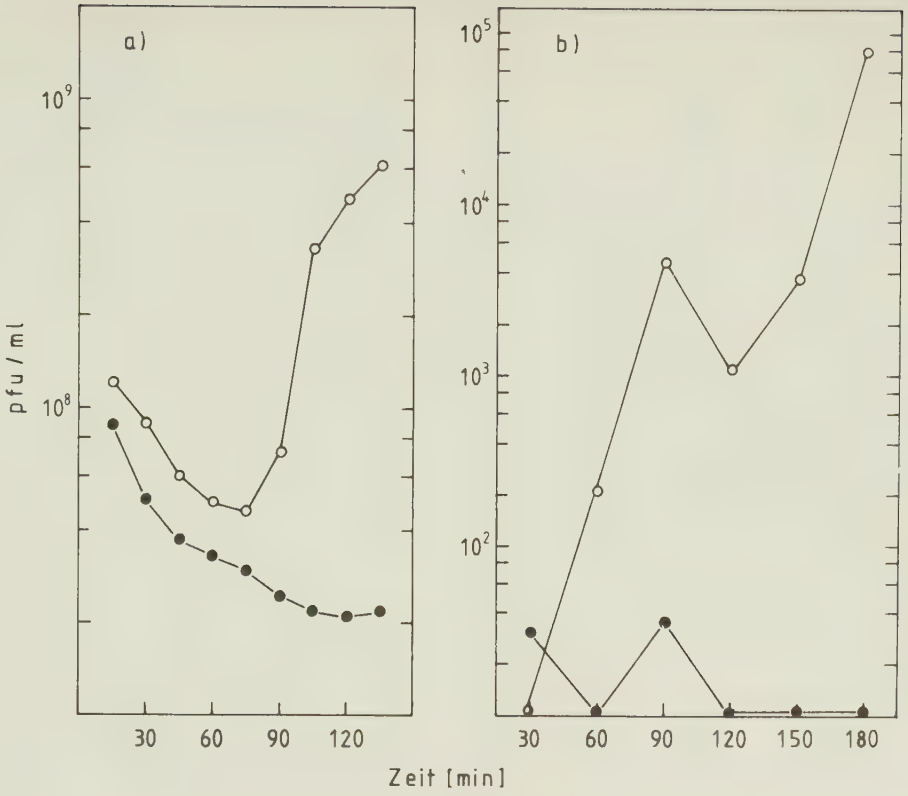

Abb.12: Einstufenwachstumskurve von P22Hy200 in a) E22 (dnaZ2016) und b) E48 (lig321) bei 28°C (o-o) und 42°C (●-●).

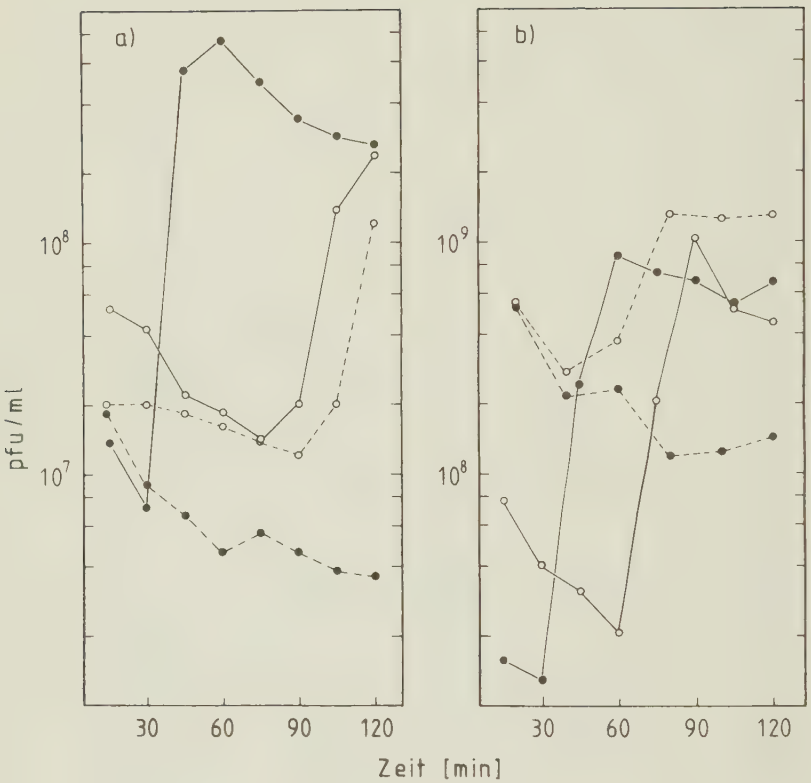

Abb.13: Einstufenwachstumskurve von P22Hy200 in den $dnaB_{ts}$-Mutanten a) E10 (dnaB70) und b) E16 (dnaB43) bei 28°C (o——o) und 42°C (●——●). λc⁻ wurde ebenfalls zur Kontrolle bestimmt: 28°C (o- -o) und 42°C (●- -●).

3.3 Versuche zum Wachstum von P22Hy200 in dnaB-Mutanten

Verschiedene DNS enthaltende Vertreter aus der sehr heterogenen Gruppe der Bakteriophagen verhalten sich durchaus unterschiedlich in $dnaB_{ts}$-Mutanten bei 42°C. Unabhängig von einer aktiven dnaB-Funktion des Wirts sind dabei sehr große Phagen (T4, P1) oder sehr kleine (ΦK aus der Gruppe II der isometrischen Phagen). Die Fähigkeit dieser Phagen, in $dnaB_{ts}$-Mutanten bei einer Temperatur zu wachsen, die für die bakterielle DNS-Synthese nicht permissiv ist, kann dabei auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein.

(a) Es liegt eine echte Unabhängigkeit vor. Der Prozess der DNS-Replikation läuft so ab, daß er ohne das bakterielle dnaB-Protein oder ein eigenes Genprodukt mit analogen Funktionen stattfindet.

(b) Der Phage codiert selbst ein Protein, das eine dnaB-ähnliche Funktion ausübt und auch bei anderen Systemen das bakterielle dnaB-Protein ersetzen kann.

(c) Das bakterielle dnaB-Genprodukt wird zwar gebraucht, es ist aber auch in defekter Form für die DNS-Replikation des Phagen verwendbar.

Die erste dieser Möglichkeiten trifft wahrscheinlich auf den kleinen einzelsträngigen Phagen ΦK zu. Die zweite Alternative wurde beim Phagen P1 gefunden /17, 89/. Dieser Phage codiert ein dnaB-analoges Protein (ban), das bei konstitutiver Exprimierung (bac) sogar die bakterielle DNS-Synthese der $dnaB_{ts}$-Mutanten bei 42°C wieder ermöglicht. Selbst ein Stamm mit einer amber-Mutation im dnaB-Protein kann ohne Suppressor wachsen, wenn er den Phagen P1bac enthält /17/. Bei diesem dnaB-Analog des P1 scheint aber auch die dritte Möglichkeit eine Rolle zu spielen: das ban-Protein wurde in einem Komplex assoziiert mit $dnaB_{ts}$-Molekülen isoliert /90/. Es stabilisiert eventuell das bakterielle hitzegeschädigte Protein /91/. Es sollte nun versucht werden zu klären, welche dieser drei Möglichkeiten auf P22, bzw. P22Hy200, zutrifft.

3.3.1 Test von P22Hy200 in verschiedenen $dnaB_{ts}$-Mutanten

Der Bereich des E. coli Chromosoms, in dem $dnaB_{ts}$-Mutationen kartieren (rechts vom Genort malB bei ca. 91 min), ist ziemlich groß. Die Kotransduktionsdaten verschiedener dnaB-Allele differieren zwischen 1% und 80% /17, 33, 133/ und die Mutanten, die in diesem Genort kartieren, lassen sich in 4 Gruppen einteilen:

(1) Typ 1: Mutanten mit "normalem" dna_{ts}-Charakter. Die dnaB-Funktion fällt nur bei nichtpermissiver Temperatur aus, die DNS-Synthese wird schnell abgeschaltet. Bei permissiver Temperatur vermehrt sich der Phage λ, bei

42°C aber nicht.

(2) Typ 2: Mutanten mit groP-Charakter. Sie wurden zum Teil auch als dnaB-Mutanten des Typ 1 isoliert. Fast alle diese Typ 2-Mutanten sind auch temperatursensibel und schalten die DNS-Synthese ebenfalls sofort ab. Der Phage λ vermehrt sich aber weder bei 42°C noch bei permissiver Temperatur /16/. Nur die Phagenmutanten $\lambda\pi A$ und $\lambda\pi B$, bei denen das Gen P mutiert ist, können auf diesen Typ 2-Mutanten bei 28°C wachsen. Einige dieser $dnaB_{ts}$-Mutanten sind schon bei sehr niedrigen Temperaturen thermosensitiv, was auf einen sehr schweren Defekt im dnaB-Protein hindeuten könnte.

(3) Typ 3: dnaB-Mutanten mit Initiationscharakter. Davon wurde erst eine beschrieben. Sie schaltet ihre DNS-Synthese bei 42°C langsam ab, kartiert aber dennoch im dnaB-Genort. Der Phage λ vermehrt sich darin bei 28°C und bei 42°C /15, 92/.

(4) Typ 4: dnaBamber-Mutanten. Auch davon ist bis jetzt nur eine bekannt. Diese Mutante hat phänotypisch Wildtypeigenschaften, ist also thermoresistent (tr), wenn sie vom supF-Suppressor supprimiert wird, aber thermosensitiv vom Typ 1, wenn der Suppressor supE vorhanden ist. Ist der Stamm lysogen für P1bac, so ist er auch ohne bakteriellen Suppressor (su^-) lebensfähig (siehe oben), jedoch nur bei Temperaturen über 34°C, da das ban-Produkt cryosensitiv ist.

Falls bei P22Hy200 eine echte Unabhängigkeit vorliegt oder der Phage für ein eigenes Protein codiert, so sollte er in allen Typen von $dnaB_{ts}$-Mutanten wachsen können und auch vom Ausmaß der Funktionsstörung nicht beeinträchtigt werden. Sollten dagegen die $dnaB_{ts}$-Genprodukte der bis jetzt getesteten Stämme nur einen geringen Schaden aufweisen und daher aufgrund einer weniger anspruchsvollen DNS-Replikation des P22Hy200 gegenüber λ auch in defekter Form für den Phagenreplikationsapparat nutzbar gewesen sein, dann könnten $dnaB_{ts}$-Mutanten existieren, die die Vermehrung des P22Hy200 nicht mehr zulassen. Da Mutanten mit groP-Charakter den Phagen λ bereits bei permissiver Temperatur an der DNS-Replikation hindern, wurde zuerst die efficiency of plating (eop, siehe 2.6.6) von P22Hy200 - und λ als Kontrolle - bei 28°C auf möglichst vielen $dnaB_{ts}$-Mutanten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab.6 zusammengefaßt.
Bis auf zwei Ausnahmen plattierte P22Hy200 auf $dnaB_{ts}$-Mutanten jeden Typs. Die eop-Werte lagen zwischen 0.4 und 1 und stellten somit keinen signifikanten Plattierungsunterschied dar. Die beiden Stämme, auf denen die eop unter 0.1 lag, sind extrem thermosensitiv. Sie durften deshalb nur bei 20°C bebrütet werden. Bei dieser Temperatur wurden aber auch auf dem Wildtypstamm E9 vom Phagen P22Hy200 nur verschwindend kleine Plaques gebildet. Da darüberhinaus die Wachstumsgeschwindigkeit der beiden Stämme E27 und E33 bei 20°C noch geringer war als die des Wildtyps E9, kann die niedrige eop

Stamm	Typ	P22Hy200	λc^-
E9		1	1
dna^+			
E10	1	0.6	0.6
dnaB70			
E16	1	0.9	0.9
dnaB43			
E37	1	0.9	0.8
dnaB454			
E50	1	0.9	0.8
dnaB1071			
E51	1	0.9	0.9
dnaB1304			
E18	2	0.8	$< 10^{-4}$
dnaB1047			
E27	2	10^{-2}	$< 10^{-7}$
dnaB22			
E29	2	0.4	10^{-2}
dnaB42			
E33	2	10^{-2}	10^{-3}
dnaB107			
E34	2	0.6	$< 10^{-4}$
dnaB279			
E39	2	0.9	10^{-4}
groPB585			
E40	2	0.6	$< 10^{-4}$
dnaB142			
E58	2	1	10^{-4}
groPB558			
E59	2	0.9	10^{-4}
groPA15			
E49	3	0.7	0.6
dnaB252			
E53(supF)	4	1	1
dnaB266am			
E54(supE)	4	0.6	0.6
dnaB266am			

Tab.6: eop von P22Hy200 und λc^- auf verschiedenen $dnaB_{ts}$-Mutanten bei permissiver Temperatur. Bedeutung der einzelnen $dnaB_{ts}$-Typen siehe Text.

des Hybrids auf diesen Stämmen durch sekundäre Effekte bedingt sein.
Der eop-Test bei permissiver Temperatur zeigte keine signifikanten Unterschiede im Verhalten von P22Hy200 in verschiedenen $dnaB_{ts}$-Mutanten. Ein gleicher Test bei 42°C ist nicht möglich, da die $dnaB_{ts}$-Mutanten bei dieser Temperatur nicht wachsen und bei einem eop-Test die Bildung eines Bakterienrasens nötig ist. Anhand von Einstufenwachstumsexperimenten waren bei 42°C, also bei abgeschalteter bakterieller DNS-Synthese, erst zwei Stämme getestet worden, E10 und E16, die beide zum Typ 1 gehören. Deshalb wurde nun geprüft, ob sich P22Hy200 auch in möglichst vielen anderen $dnaB_{ts}$-Mutanten bei nichtpermissiver Temperatur (42°C) vermehren kann. Dabei wurde bei fast allen Stämmen auch eine Infektion mit dem Phagen λ zur Kontrolle durchgeführt.
Auf den Abb.14 - 18 ist das Ergebnis zu sehen: In drei weiteren Mutanten vom Typ 1, E37 (dnaB454), E51 (dnaB1304) (Abb.14) und E50 (dnaB1071) (Abb.15a) wuchs das Hybrid P22Hy200 ebenso wie in E49 (dnaB252), der Mutante vom Typ 3 (Abb.15b). Vier Vertreter vom Typ 2, also mit groP-Charakter, wurden ebenfalls getestet. In E18 (dnaB1047), E29 (dnaB42) (Abb.16), E34 (dnaB279) und E39 (groPB585) (Abb.17) vermehrte sich der Phage ebenfalls bei 42°C. Auch die Mutante vom Typ 4 (dnaB266am) wurde in unterschiedlichen supprimierten Zuständen getestet. In der thermoresistenten Form (E53 (dnaB266am, supF)) wuchs P22Hy200 ebenso wie in der thermosensitiven Form vom Typ 1 (E54 (dnaB266am, supE)) (Abb.18). Das Wachstum von P22Hy200 im Stamm E55 (dnaB266am, su^-, P1bac), in dem die amber-Mutation nur durch das P1 dnaB-Analog ban supprimiert wird, wurde nicht in einem Einstufenwachstumsexperiment geprüft.
Dieser Stamm ist cryosensitiv, d.h. er wächst nicht bei Temperaturen unter 34°C, aber bei 42°C. Dies ist auf die Cryosensitivität des ban-Produkts des Phagen P1 zurückzuführen, und zwar liegt das ban-Protein bei niedrigen Temperaturen in zu geringer Menge vor, um das dnaB-Genprodukt des Wirts stabilisieren zu können /110/. Prinzipiell wäre es möglich auch in diesem Stamm das Wachstum von P22Hy200 in einem Einstufenwachstumsexperiment zu testen. Dabei müßte der Stamm bei hoher Temperatur gezogen und dann bei niedriger Temperatur inkubiert werden. Die Phageninfektion müßte zu einem Zeitpunkt erfolgen bei dem die Menge an ban-Protein auf das Minimum gesunken ist. Sollte sich P22Hy200 zwar mit Hilfe eines defekten dnaB-Proteins replizieren können, aber letztlich doch abhängig von dessen Anwesenheit sein, dann dürfte unter diesen Bedingungen entweder gar keine oder nur eine ganz geringe Menge Phagennachkommen freigesetzt werden. In einem solchen Experiment sind aber zwei große Unsicherheitsfaktoren enthalten: es ist nichts darüber bekannt, in welchem Zeitraum die Konzentration des ban-Proteins nach dem Temperaturshift niedrig genug ist, um keinen Einfluß mehr auf das Verhalten von P22Hy200 auszuüben. Anders als bei einem Shift zu höheren Temperaturen muß hier eine Abnahme der produzierten Phagen nicht unbedingt eine Abhängigkeit vom dnaB-Genprodukt bedeuten, da bei niedriger Temperatur generell weniger Phagennachkommen gebildet werden. Eine

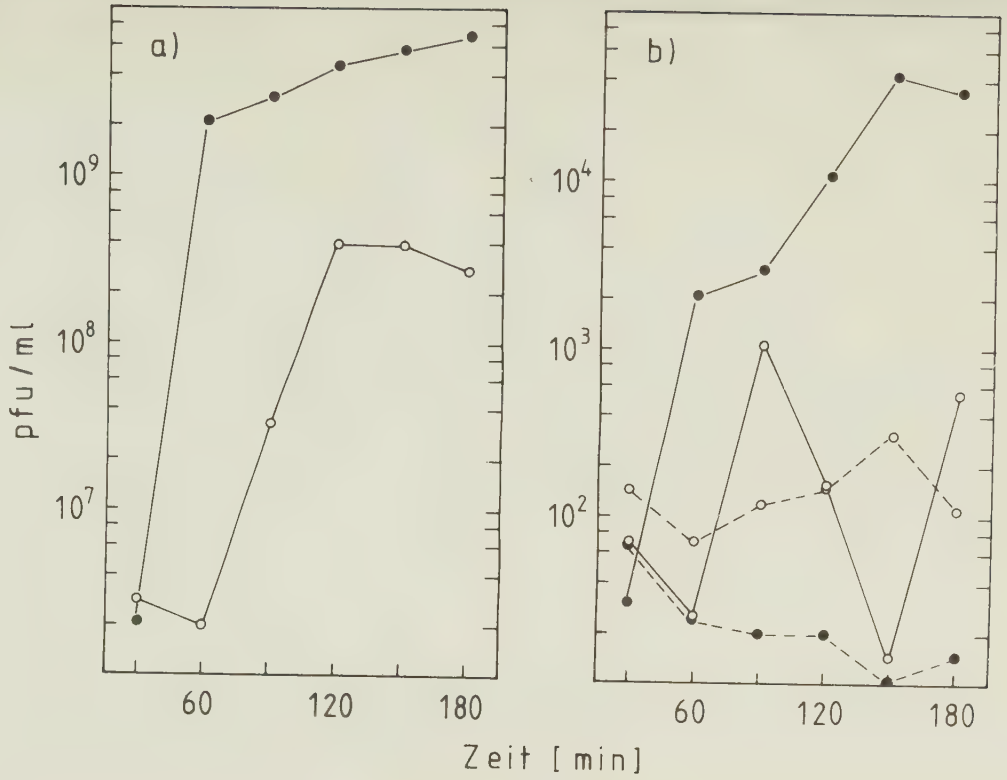

Abb.14: Einstufenwachstumskurve von P22Hy200 in 2 Typ 1 dnaB$_{ts}$-Mutanten: a) E37 (dnaB454) und b) E51 (dnaB1304) bei 28°C (o——o) und 42°C (●——●), λc- 28°C (o- -o), 42°C (●- -●).

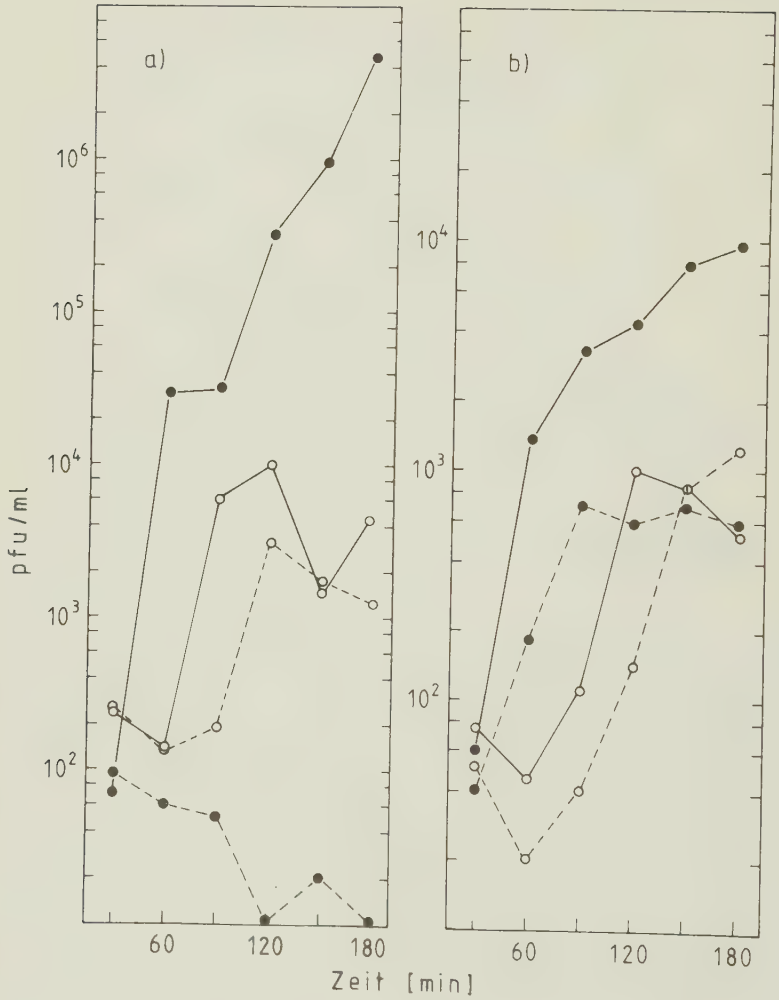

Abb.15: Einstufenwachstumskurve von P22Hy200 in 2 $dnaB_{ts}$-Mutanten: a) E50 (dnaB1071, Typ 1) und b) E49 (dnaB252, Typ 3) bei 28°C (o——o) und 42°C (●——●), λc^- 28°C (o- -o), 42°C (●- -●).

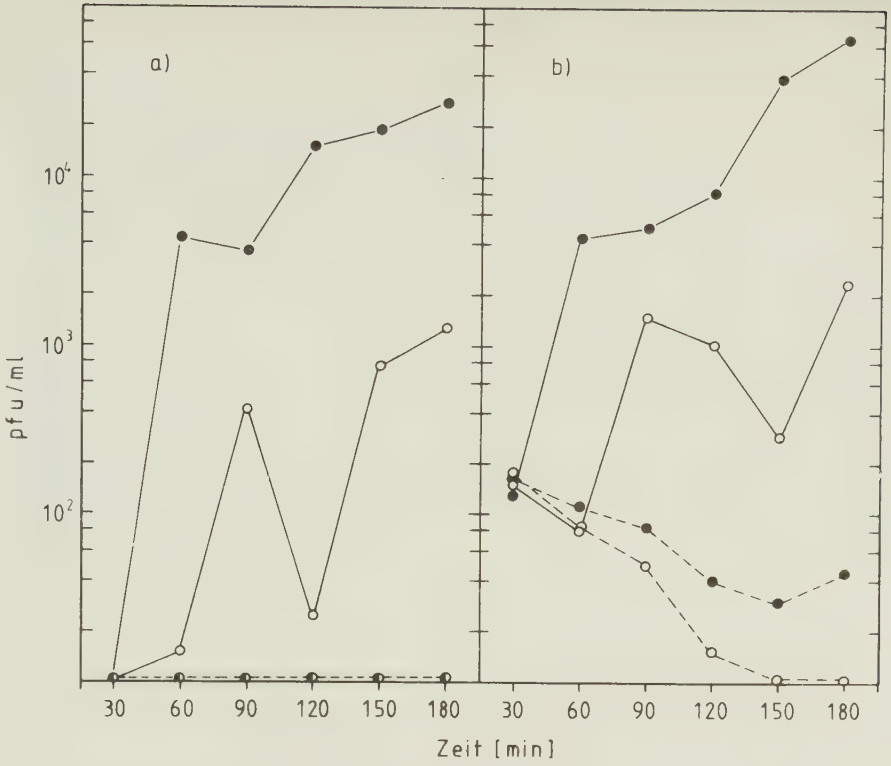

Abb.16: Einstufenwachstumskurve von P22Hy200 in 2 Typ 2 dnaB$_{ts}$-Mutanten: a) E29 (dnaB42) und b) E18 (dnaB1047) bei 28°C (o——o) und 42°C (●——●), λc⁻ 28°C (o- -o), 42°C (●- -●).

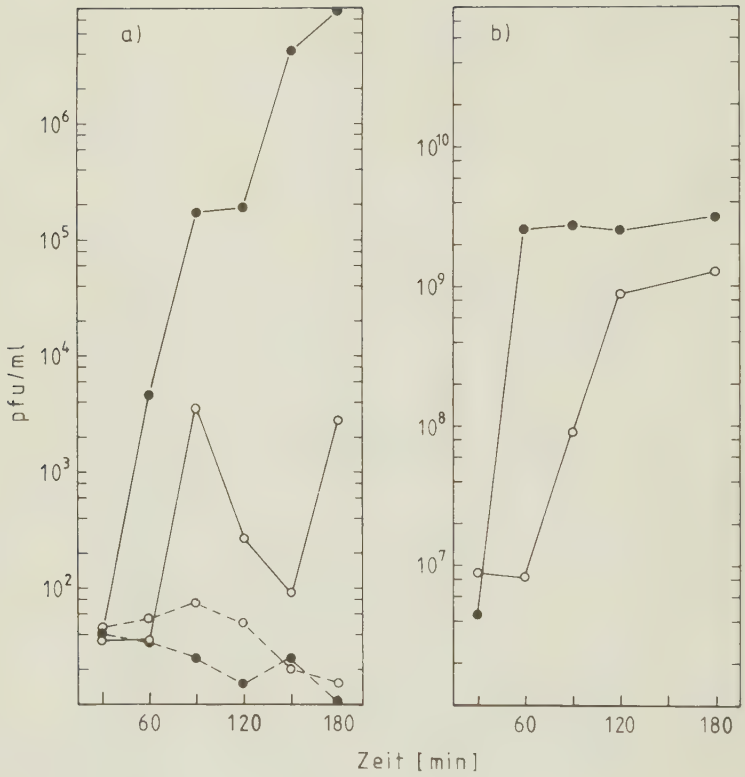

Abb.17: Einstufenwachstumskurve von P22Hy200 in 2 dnaB$_{ts}$-Mutanten vom Typ 2: a) E34 (dnaB279) und E39 (groPB585) bei 28°C (o——o) und 42°C (●——●), λc^- 28°C (o- -o), 42°C (●- -●).

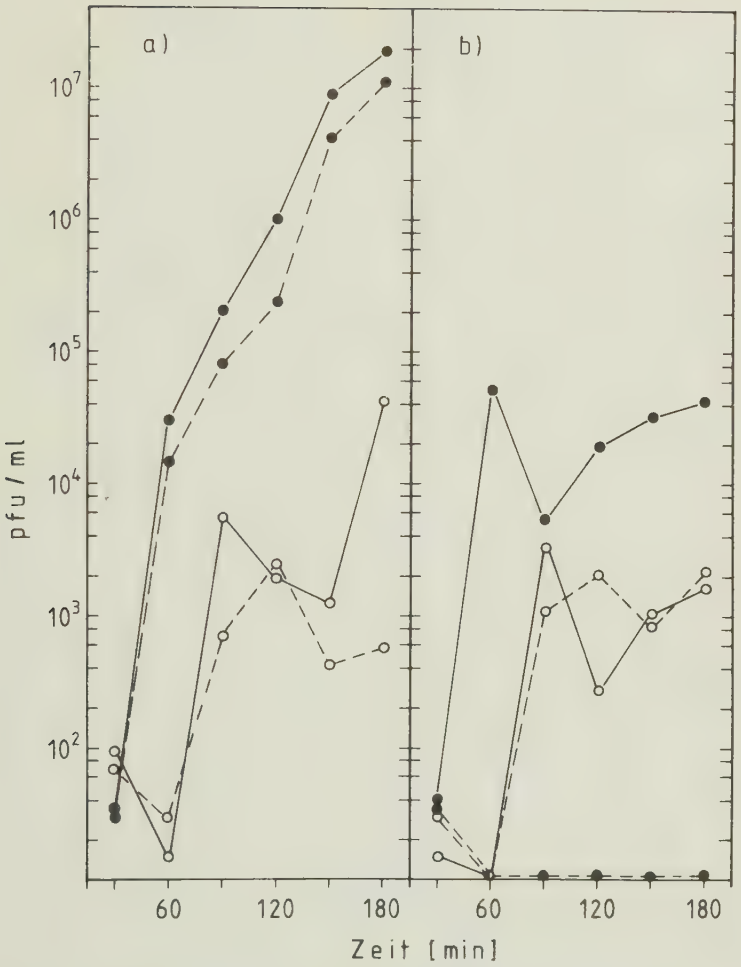

Abb.18: Einstufenwachstumskurve von P22Hy200 in der Typ 4 dnaB-Mutante: a) E53 (dnaB266am, supF, tr) und E54 (dnaB266am, supE, ts) bei 28°C (o——o) und 42°C (●——●), λc^- 28°C (o- -o), 42°C (●- -●).

sichere Schlußfolgerung könnte daher nicht gezogen werden. Da aber der Phage λ auch bei 42°C nicht in dieser Mutante wächst, wurde bei dieser Temperatur zumindest die eop von P22Hy200(E9(P1)) bestimmt. Das Phagenlysat für diesen Versuch mußte in einem P1-lysogenen Stamm gezogen werden, da P22Hy200 sonst nicht gegen die P1-spezifische Restriktion geschützt ist. Während bei λ auf diesem Stamm winzige Plaques in einer eop von 8.5×10^{-4} entstanden, waren die P22Hy200 Plaques von normaler Größe und einer eop von 0.41. Das Hybrid kann sich also auch in diesem Stamm vermehren. Ob dies auf einer besseren Nutzung des stabilisierten dnaB-Proteins oder einer echten Unabhängigkeit beruht, läßt sich allerdings nicht entscheiden.

Mit den Mutanten E27, E33 und E40, die schon bei sehr niederen Temperaturen thermosensitiv sind, konnten leider keine Einstufenwachstumsexperimente durchgeführt werden, da die Zellen auch in der logarithmischen Wachstumsphase in einem zu schlechten Zustand (Schlangenbildung) für eine Phageninfektion waren. Da P22Hy200 in allen getesteten $dnaB_{ts}$-Mutanten bei 42°C wuchs, konnte noch keine der drei möglichen Ursachen für die Unabhängigkeit vom aktiven bakteriellen dnaB-Protein ausgeschlossen werden. Es wurde versucht, das Problem von einer anderen Seite anzugehen.

D'Ari et al. /17/ und Ogawa /89/ fanden, daß P1-lysogene $dnaB_{ts}$-Mutanten um den Faktor 10^3 häufiger hitzeresistente Kolonien bildeten als alysogene. Aufgrund genetischer Analysen stellte sich heraus, daß P1 ein eigenes dnaB-Analog codiert, das ban-Protein. Dieser Phage integriert nicht in das bakterielle Chromosom, sondern liegt im Prophagenzustand als stabiles Plasmid vor /94/. Das Phagengenom muß also parallel zum bakteriellen Chromosom selbständig repliziert werden, damit es auf die Tochterzellen weitervererbt wird. Daher wird immer eine bestimmte Menge an phageneigenen Replikationsenzymen exprimiert. Diese Expression unterliegt einer strengen Regulation. Wenn aber bedingt durch eine Mutation in dieser Regulation das ban-Protein konstitutiv gebildet wird (bac), sind so viele ban-Kopien in einer Zelle, daß auch die bakterielle DNS bei nichtpermissiver Temperatur durch eine Stabilisierung des geschädigten dnaB-Protein des Wirts durch die ban-Moleküle repliziert werden kann /17, 89/.

P22 und λ sind als Prophagen in das bakterielle Chromosom integriert. Beim Phagen λ verhindert in diesem Zustand der Repressor u.a. die Ablesung der Replikationsgene /95/. Eine ähnlich strenge Reprimierung liegt wahrscheinlich auch bei P22 vor, wurde aber noch nicht eindeutig nachgewiesen. Sollten bei diesem Phagen im Gegensatz zu λ ein Minimum an Replikationsenzymen im Prophagenzustand exprimiert werden, so müßten auch hier konstitutive Mutanten gefunden werden, die - analog zu P1 - zu einer größeren Anzahl von hitzeresistenten $dnaB_{ts}$-Mutanten führen können.

Eine Reihe $dnaB_{ts}$-Mutanten wurde mit P22Hy180 (c^+) lysogenisiert und die Lebendkeimzahl (LKZ) der lysogenen und der alysogenen Bakterien bei 28°C und 42°C verglichen (siehe 2.6.5). Die Werte sind in Tab.7 zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß die Anwesenheit des Hybrids keinerlei Einfluß auf

Stamm	Typ	P22Hy200 lysog.	P22Hy200 alysog.
E9 dna+		1	1
E10 dnaB70	1	10^{-8}	10^{-8}
E16 dnaB43	1	10^{-8}	$< 10^{-8}$
E37 dnaB454	1	10^{-8}	10^{-8}
E50 dnaB1071	1	10^{-8}	10^{-8}
E51 dnaB1304	1	10^{-7}	10^{-7}
E18 dnaB1047	2	10^{-8}	10^{-8}
E29 dnaB42	2	10^{-8}	10^{-8}
E34 dnaB279	2	10^{-8}	10^{-8}
E39 groPB585	2	10^{-8}	10^{-8}
E49 dnaB252	3	$< 10^{-9}$	$< 10^{-9}$
E53 (supF) dnaB266am	4	1	1
E54 (supE) dnaB266am	4	10^{-8}	10^{-8}

Tab.7: Häufigkeit hitzeresistenter Kolonien verschiedener $dnaB_{ts}$-Mutanten lysogen und alysogen für P22Hy200, errechnet aus dem Verhältnis der LKZ bei 28°C zu der bei 42°C.

die Überlebensfähigkeit der $dnaB_{ts}$-Mutanten bei 42°C hatte. Bei P22Hy180 werden also entweder im Prophagenzustand keine Replikationsgene exprimiert, oder eventuell vorhandene Genprodukte können nicht als dnaB-Analog für die bakterielle DNS-Replikation komplementieren.
Auch eine weitere gängige Methode, die Komplementation einer ausgefallenen Funktion durch ein anderes Protein zu testen - die Mischinfektion, konnte in diesem Fall nicht angewendet werden. Bei einer Mischinfektion wird eine Zelle mit verschiedenen Phagen infiziert. Der eine Phage ist in einer Funktion defekt, der andere kann sie ausüben. Kann nun der intakte Phage die defekte Funktion im anderen System ersetzen, werden beide Phagen repliziert. Die Replikationsproteine von P22 und λ können sich aber auch in Wirten, in denen der bakterielle DNS-Replikationsapparat intakt ist, nicht komplementieren /37/. Daher konnte nicht geprüft werden, ob P22Hy200 die λ DNS-Replikation in $dnaB_{ts}$-Mutanten ermöglichen kann. Andere Kriterien mußten gefunden werden.

3.3.2 Phagenproduktion von P22Hy200 in E58

Für den nächsten Versuch wurde eine der dnaB$_{ts}$-Mutanten vom Typ 2 verwendet. Diese Mutante, E58, trägt die Mutation groPB558. Wie auf allen Stämmen dieses Typs vermehrt sich der Phage λ auch in dieser Mutante weder bei 28°C noch bei 42°C. Über diesen Stamm standen einige biochemische Daten zur Verfügung: die Adenosintriphosphatase-Aktivität, die normalerweise mit dem dnaB-Protein verbunden ist /93/, konnte bei diesem Stamm nicht nachgewiesen werden. Im in-vitro-Test konnte mit Extrakten dieses Stammes auch die Umwandlung der einzelsträngigen DNS des Phagen ΦX174 in die replikative, doppelsträngige Form (dnaB-abhängig) nicht stimuliert werden. Dies könnte auf eine sehr geringe Kopienzahl des dnaB-Proteins in diesem Stamm gegenüber der Menge in einer Wildtyp Zelle hindeuten /H. Schuster, persönliche Mitteilung/. Die Unfähigkeit des Phagen λ, in diesem Stamm zu replizieren, wäre dann auf diese geringe Konzentration an dnaB-Protein zurückzuführen.
Auch bei dieser Mutante hört die bakterielle DNS-Synthese bei hoher Temperatur auf. Ein hitzesensitiver Defekt in der Regulation des dnaB-Proteins ist daher denkbar. Es könnte bei steigenden Temperaturen immer weniger dnaB-Produkt gebildet werden, so daß bei hoher Temperatur die bakterielle DNS-Replikation zum Erliegen kommt. Ist nun P22Hy200 völlig unabhängig vom bakteriellen dnaB-Protein, sollte eine niedrigere Kopienzahl des dnaB-Genprodukts keinen Einfluß auf die Menge der Phagennachkommen haben. In einem Wildtypstamm und in der Mutante müßten dann bei jeder Temperatur gleich viele Phagen pro infizierter Zelle gebildet werden. Deshalb wurde in den Stämmen E57 (WT) und E58 (groPB558) eine genaue Bestimmung der "burst size" durchgeführt.
Für dieses Experiment wurde der Versuchsablauf gegenüber 2.6.17 etwas variiert. Um einer möglichen thermosensiblen Regulation des dnaB-Proteins Rechnung zu tragen, wurden die Kulturen bei der Temperatur gezogen, bei der die Phagenvermehrung geprüft wurde. Da E58 bei 41°C noch wuchs, wurde das Experiment bei 28°C, 37°C und 41°C ausgeführt. Zur genauen Bestimmung der Phagenzahl, die pro infizierter Zelle freigesetzt werden (burst size), mußte die Zahl der infizierten Komplexe bestimmt werden. Dafür wurden bei den ersten Zeiten die Proben vor dem Abzentrifugieren (infizierte Komplexe und freie Phagen) und nach der Zentrifugation (freie Phagen) titriert. Die infizierten Komplexe sind dann die Differenz zwischen beiden Werten. Die Zahl der im ersten Vermehrungszyklus produzierten Phagen dividiert durch die infizierten Komplexe ergibt die mittlere "burst size".
Die Einstufenwachstumskurven sind in Abb.19 dargestellt. Im Wildtyp E57 betrug die burst size bei 28°C 8 Phagen, steigerte sich auf 59 bei 37°C und bei 41°C auf 90. Im Stamm E58 (groPB558) wurden bei 28°C durchschnittlich 17 Phagen pro infizierter Zelle frei, bei 37°C 54, bei 41°C dagegen nur 6 Phagen. Das sind nur 11% der Phagenmenge, die im gleichen Stamm bei 37°C freigesetzt wurden.

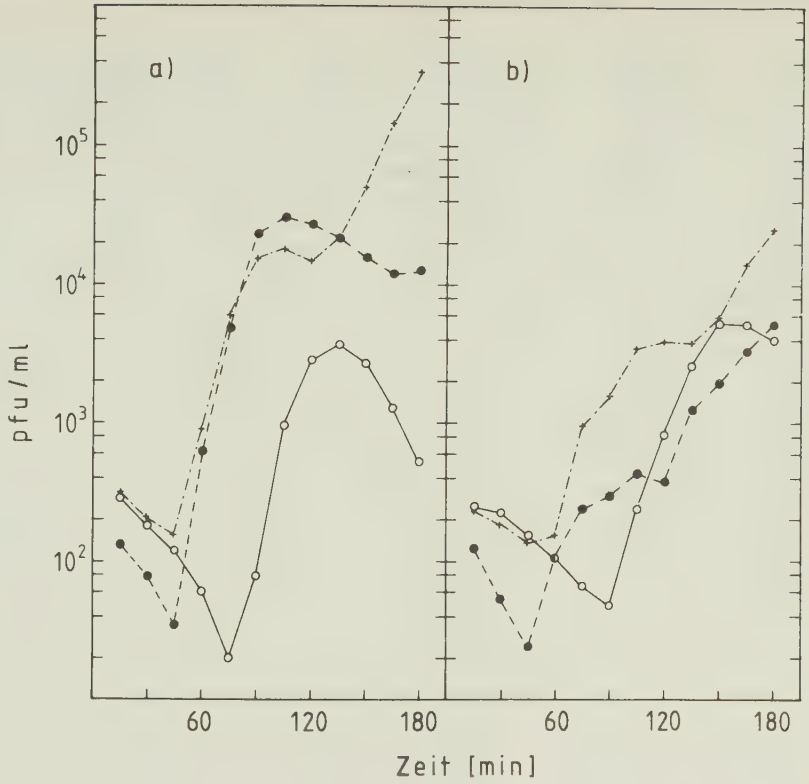

Abb.19: Einstufenwachstumskurve von P22Hy200 in a) E57 (WT) und b) in der Typ 2 dnaB$_{ts}$-Mutante E58 (groPB558) bei 28°C (o——o), 37°C (+— - —+) und 41°C (●- - -●).

Vergleicht man die Ergebnisse bei Wildtyp und Mutante, so vermehrt sich P22Hy200 bei 37°C in beiden gleich gut, bei 28°C in der Mutante etwas besser. Bei 41°C jedoch beobachtet man einen drastischen Unterschied: in der Mutante werden 93% weniger Phagen als im Wildtyp produziert. Daraus können zwei Schlußfolgerungen gezogen werden:

(a) Der Replikationsapparat des P22Hy200 muß mit dem dnaB-Genprodukt des Wirts interagieren, da sich P22Hy200 in $dnaB_{ts}$-Mutanten bei 42°C zwar vermehrt, die Menge der freigesetzten Phagen aber entweder vom Zustand oder der Kopienzahl des bakteriellen dnaB-Proteins abhängig ist.

(b) Die Affinität des Replikationsapparates von P22Hy200 zum dnaB-Protein muß so groß sein, daß eine Phagen-DNS-Replikation stattfinden kann, obwohl das dnaB-Genprodukt in der groP-Mutante quantitativ oder qualitativ verändert ist.

3.3.3 Liegt eine Protein/Protein-Wechselwirkung vor?

Die bisherigen Ergebnisse könnten damit erklärt werden, daß das bakterielle dnaB-Genprodukt mit einem phagencodierten Protein einen Komplex bildet und dadurch auch in der hitzegeschädigten Form soweit stabilisiert wird, daß es die für die Phagen-DNS-Replikation nötigen Funktionen ausüben kann. Trifft diese Annahme zu, müßten Mutanten von P22Hy200 isoliert werden können, die nicht mehr in der Lage sind, das geschädigte bakterielle dnaB-Protein zu stabilisieren. Solche Mutanten sollten sich bei 42°C in einer $dnaB_{ts}$-Mutante nicht mehr vermehren können und damit eine strenge Abhängigkeit vom aktiven dnaB-Protein des Wirts zeigen.
Eine Selektion solcher Phagenmutanten bei 42°C durch Stempeln auf eine $dnaB_{ts}$-Mutante des Typ 1 war ausgeschlossen, da von diesen Bakterienmutanten bei dieser Temperatur kein Rasen mehr gebildet wird. Auf groP-Mutanten aber sollte sich die gesuchte Phagenmutante wie λ verhalten und daher auch bei 28°C keine Plaques bilden können. Auf einer solchen groP-Mutante als Indikator sollten dann über die Stempeltechnik oder die Doppelschichtmethode Phagen identifiziert werden können, die sich in $dnaB_{ts}$-Mutanten nicht mehr vermehren.
Bei der Mutagenese des P22Hy200 und der anschließenden Selektion der Phagenmutanten wurden Bakterienstämme mit gleichem Suppressor verwendet, um auch amber-Mutationen zu erfassen. Da alle dnaB-Mutanten vom Typ 2 su^- waren, wurde in den Stamm E39 mit Hilfe der P1 Transduktion (siehe 2.6.9) der Genort supE aus dem Stamm E74 transferiert. Der resultierende Stamm E73 (groPB585, supE) wurde dann zur Selektion verwendet.
Die chemische Mutagenese des P22Hy200 wurde im Stamm E74 durchgeführt. Eine Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase wurde abzentrifugiert, in 1/10 Volumen GTM-Medium aufgenommen und mit P22Hy200 mit einer moi von 5 infiziert. Nach 10 min Adsorptionszeit wurden Aliquots der infizierten

Kultur 1:20 in GTM-Medium mit verschiedenen NG-Konzentrationen verdünnt und 30 min bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubiert. Die infizierten Zellen wurden abzentrifugiert und im gleichen Volumen NG-freien GTM-Medium bis zur Lyse inkubiert. Der Ablauf der Mutagenese folgte im wesentlichen der von Gottesman und Yarmolinsky 1968 /25/ beschriebenen Methode. Mit einer Konzentration von 25 µg NG/ml wurden 2.5% amber-Mutanten erzielt. Dieses Lysat wurde für die Isolierung der gesuchten Phagenmutanten verwendet.
Zur Selektionierung wurde die Doppelschichtmethode angewandt: E74, in dem die gesuchten Phagenmutanten wachsen können, wurde mit einer geeigneten Verdünnung des mutagenisierten Lysats infiziert und plattiert. Nach dem Erstarren wurde diese Weichagarschicht mit einer zweiten Lage Weichagar bedeckt, die E73 enthielt - also den Stamm, in dem die gesuchten Mutanten nicht vermehrungsfähig sein sollen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet. Phagen, die sich in beiden Indikatoren vermehren konnten, bildeten völlig klare Plaques, während Phagenmutanten, die nur in E74 Phagennachkommen produzierten, als überwachsene Plaques erkennbar waren. Von 2.2×10^4 Plaques wurden 180 als überwachsen identifiziert und isoliert. Nach Tropftests und mehreren Reinigungen über Einzelplaqueisolate war nur noch bei zwei stabilen Mutanten ein deutlicher Unterschied im Plattierungsverhalten auf E74 und E73 reproduzierbar. Diese Mutanten wurden sab47 und sab116 genannt (sab für strenge Abhängigkeit vom aktiven dnaB-Genprodukt).
Mit diesen beiden Phagenmutanten wurde ein eop-Vergleich auf zwei Stämmen mit dem supE-Suppressor (su^+), E74 und E73, und zwei su^--Stämmen, E9 und E39 durchgeführt. E74 und E9 sind bezüglich des dnaB-Allels Wildtyp, E73 und E39 tragen die $dnaB_{ts}$-Mutation groPB585. Zum Vergleich wurde auch die eop von P22Hy200, λc^- und $\lambda \pi B$ auf diesen Stämmen bestimmt. (Der Phage $\lambda \pi B$, eine λ Mutante im Gen P, zeichnet sich dadurch aus, daß er in allen groP-Mutanten wachsen kann /16/.) Der eop-Wert der Phagen auf dem su^+- und dem su^--Stammpaar und das Verhältnis des Phagentiters auf E9 (WT, su^-) zu dem auf E74 (WT, su^+) wurden berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab.8 und 9 zusammengestellt.
P22Hy200 plattierte auf allen Stämmen gleich gut. λc^- wuchs auf den groPB585-Stämmen (E73 und E39) erwartungsgemäß nur mit einer eop von 10^{-4}, aber auf E74 und E9 gleich, da dieser Phage keine amber-Mutation trägt. $\lambda \pi B$ plattierte auf den groP-Mutanten etwas schlechter, unterschritt aber nicht den Wert 0.1. Die Mutante sab47 zeigte bei keinem der drei eop-Werte drastische Unterschiede. Anders dagegen die Hybridmutante sab116: Der eop-Wert des su^+-Paares E73/E74 liegt unter 10^{-3}, und bei den su^--Stämmen waren bei keiner der plattierten Verdünnungen Plaques zu finden. Der Unterschied im Plattierungsverhalten auf dem su^-- und su^+-Wildtypstamm läßt eine amber-Mutation vermuten.
Auffällig ist die unterschiedliche Plaquegröße der verschiedenen Phagen auf den getesteten Stämmen (Tab.9). Während Hybrid und λ überall große Plaques bildeten, waren die $\lambda \pi B$ Plaques auf den groP-Stämmen winzig. Anscheinend wächst dieser Phage in diesen Stämmen entweder wesentlich langsamer

Phagen	E73/E74 su^+	E39/E9 su^-	E9/E74 su^-/su^+
P22Hy200	0.9	0.9	1
λc^-	1.4×10^{-4}	1.5×10^{-4}	1
$\lambda \pi B$	0.21	0.33	0.97
sab47	0.17	0.38	0.75
sab116	$< 10^{-3}$	0	2.2×10^{-3}

Tab.8: eop-Vergleich verschiedener Phagen auf E. coli Stämmen. E74 (WT) und E73 (groPB585) können amber-Mutationen supprimieren (su^+), E9 (WT) und E39 (groPB585) codieren keinen Suppressor (su^-).

	su^+		su^-	
Phagen	E74 dna^+	E73 groPB585	E9 dna^+	E39 groPB585
P22Hy200	++	++	++	++
λc^-	++	++	++	++
$\lambda \pi B$	++	(-)	++	(-)
sab47	++	(-)	+	(-)
sab116	(+)	-	-	-

Tab.9: Morphologie der entstandenen Plaques der verschiedenen Phagen auf E74 (WT, supE), E73 (groPB585, supE), E9 (WT, su^-) und E39 (groP585, su^-). Die Plaquegröße wird durch folgende Zeichen symbolisiert: ++ groß, + mittel, (+) klein, (-) winzig, - keine Plaques sichtbar.

Phagen	28°C	37°C	42°C
sab47	8.7×10^9	1.4×10^{10}	$< 10^5$
sab116	9.9×10^7	2.2×10^{10}	$< 10^5$

Tab.10: Plattierungsverhalten zweier P22Hy200 Mutanten bei verschiedenen Temperaturen auf dem Wildtyp E74.

oder mit einer stark veringerten burst size. Die Mutante sab47 zeigte deutliche Plaqueunterschiede zwischen Wildtyp und groP-Mutanten. Auf den dna$^+$-Stämmen bildete sie große (E74) bis mittelgroße (E9) Plaques, aber nur winzige auf E73 und E39 (groPB585). Dieses Verhalten gleicht dem von $\lambda\pi$B und dürfte auf die gleichen Ursachen zurückzuführen sein. Die Hybridmutante sab116 zeigte den deutlichsten Unterschied: nur auf dem su$^+$-Wildtyp Stamm waren Plaques zu finden, aber auch diese waren winzig klein. Auch bei optimalen Bedingungen konnten nur verschwindend kleine Plaques dieser Mutante auf E73 gefunden werden.
Beide Mutanten von P22Hy200 waren stark thermosensibel (Tab.10). Dies unterscheidet die Mutante sab47 wieder von $\lambda\pi$B, der ebenso wie P22Hy200 und λ bei 42°C auf den Wildtypstämmen normal plattiert. Die Phagenmutante sab116 ist zusätzlich auch noch cryosensitiv, der Titer ist bei 28°C um mehr als zwei Zehnerpotenzen niedriger als bei 37°C. Aufgrund dieser Temperatursensibilität konnte mit keiner der beiden Phagenmutanten ein Einstufenwachstumsexperiment in einer dnaB$_{ts}$-Mutante vom Typ 1 bei 42°C durchgeführt werden. Daher kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob sich diese P22Hy200 Mutanten wie λ in dnaB$_{ts}$-Mutanten vom Typ 1 bei 42°C nicht vermehren.

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit bakterielle Replikationsproteine an der DNS-Replikation des Salmonella Phagen P22 beteiligt sind. Infolge der geringen Anzahl von bekannten dna_{ts}-Mutanten beim natürlichen Wirt des Phagen P22, Samonella typhimurium, und der nahen Verwandtschaft von S. typhimurium und Escherichia coli wurde zur Beantwortung dieser Fragestellung auf die große Zahl gut charakterisierter E. coli dna_{ts}-Mutanten zurückgegriffen. Diese Mutanten sind konditional letal durch Thermosensibilität, d.h. ein Protein, beteiligt an der DNS-Synthese, ist so mutiert, daß es nur bei niedriger Temperatur seine Funktion erfüllen kann (permissive Temperatur, in dieser Arbeit 28°C). Bei hoher Temperatur ist das Protein derart geschädigt, daß eine DNS-Replikation nicht mehr stattfinden kann (nichtpermissive Temperatur, in der Regel 42°C).
Da eine normale Infektion von E. coli Zellen mit dem Salmonella Phagen P22 aufgrund der strengen Wirtsspezifität der Phagenadsorption nicht möglich ist, wurde der Phage in E. coli dna_{ts}-Mutanten mit Hilfe eines $F'pro^{+}lac^{+}$-Episoms mit integriertem P22 transferiert. Durch die anschließende Induktion des P22 mit UV-Licht zum lytischen Wachstum konnte dann die Vermehrungsfähigkeit des Phagen in den E. coli dna_{ts}-Mutanten getestet werden. Als nichtpermissive Temperatur in diesem Versuchsansatz durfte 38°C nicht überschritten werden, da ein thermosensibler früher Schritt nach der Induktion des P22 die Phagenvermehrung bei höheren Temperaturen verhindert. Unter diesen Bedingungen wurde das Verhalten von P22 in mehreren dna_{ts}-Mutanten geprüft: in der initiationsdefekten Mutante E2 (dnaA) vermehrte sich der Phage bei 38°C, die Elongationsfunktionen der Genprodukte dnaE (E6) und dnaG (E21) waren dagegen für die DNS-Replikation des P22 unentbehrlich. In zwei elongationsdefekten $dnaB_{ts}$-Mutanten, E10 (dnaB70) und E16 (dnaB43) jedoch wurden Phagennachkommen produziert.
Die Phagenproduktion im Stamm mit der dnaA-Mutation (E2) ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Backhaus und Schmieger (1979) /34/, die in der S. typhimurium dnaA1-Mutante eine normale Phagen-DNS-Replikation und Reifung der Phagenpartikel bei abgeschalteter bakterieller DNS Replikation beobachteten. Der dnaA1-Genort bei S. typhimurium kartiert an einer analogen Stelle zum dnaA-Genort in E. coli /26/. Vergleicht man die weiteren Befunde bei P22 mit den Bedürfnissen des nahe verwandten E. coli Phagen λ, so findet sich Übereinstimmung in der Abhängigkeit von funktionellen Produkten der Gene dnaE und dnaG. Das Verhalten der beiden Phagen in $dnaB_{ts}$-Mutanten ist jedoch unterschiedlich: λ ist abhängig vom dnaB-Protein, er kann sich in einer solchen Mutante bei 42°C nicht vermehren, P22 dagegen wächst in beiden getesteten $dnaB_{ts}$-Stämmen. Dieser Unterschied machte eine Absicherung des Befundes nötig.
Die Kurzzeitmarkierung der bakteriellen DNS (Pulsmarkierung)

der beiden $dnaB_{ts}$-Mutanten E10 und E16 mit ^{3}H-Thymidin zeigte, daß bei 42°C die bakterielle DNS-Synthese schon nach 5 min völlig abgeschaltet war. Bei 38°C wurde eine Restsyntheseaktivität von 40% (E10) bzw. 49% (E16) bezogen auf die Einbaurate bei 28°C zum gleichen Zeitpunkt beobachtet. Auch die UV-Induktion des Phagen λ unter den gleichen Bedingungen wie zuvor bei P22 stellte eine Unabhängigkeit der P22-DNS-Replikation vom dnaB-Genprodukt in Frage, schloß sie aber nicht aus. Es war unbedingt erforderlich, die weiteren Versuche bei einer Temperatur auszuführen, die eine restliche Aktivität der dna_{ts}-Proteine verhinderte.
Ermöglicht wurde dies durch die Konstruktion eines λ/P22-Hybridphagen. Genetische Befunde und die Kartierung mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII zeigten, daß dieser Hybridphage, P22Hy180 (c^+) bzw. P22Hy200 (eine spontane Klarplaquemutante von P22Hy180), die frühen Gene 24, c_2, 18, 12 und 23 von P22 enthält. Das Genprodukt 24 hat analog zum Protein N von λ regulatorische Funktionen, c_2 codiert den Repressor (c_I bei λ), die Produkte der Gene 18 und 12 sind analog zu den Genprodukten O und P von λ und direkt an der DNS-Replikation beteiligt und das Protein 23, in Analogie zum Protein Q bei λ, kontrolliert die Expression der späten Gene. Die Lysisfunktion 13 muß in diesem Hybrid von P22 sein, unklar dagegen ist, inwieweit die Lysisfunktion R von λ ebenfalls durch das entsprechende P22 Gen 19 ausgetauscht ist. Die übrigen Gene, also auch diejenigen, die für morphogenetische Proteine und Hüllkomponenten codieren, stammen von λ. Damit hat dieser Hybridphage die Hülle von λ und kann an E. coli Zellen adsorbieren. Der Bereich der frühen Gene dagegen stammt von P22 und somit wird die DNS-Replikation von P22 Genen gesteuert.
E. coli dna_{ts}-Mutanten konnten nun mit diesem Hybrid lytisch infiziert und die Vermehrung bei völlig abgeschalteter bakterieller DNS-Synthese (42°C) getestet werden. Anhand von Einstufenwachstumsexperimenten ließen sich die Ergebnisse der UV-Induktion in E6 (dnaE) und E21 (dnaG) bestätigen. Versuche mit weiteren dna_{ts}-Mutanten ergaben, daß P22Hy200 unabhängig von der Initiationsfunktion dnaC (E4) ist, jedoch die Produkte von dnaZ (E22), lig (E48) und dnaK (E24) an seiner DNS-Replikation beteiligt sein müssen. Im wesentlichen entsprechen auch diese Bedürfnisse denen von λ. Ein kleiner Unterschied besteht bezüglich dnaK: λ kann sich auch bei permissiver Temperatur nicht in dieser Mutante vermehren, P22Hy200 zeigt erst bei 42°C Abhängigkeit vom Genprodukt.
Weitaus der interessanteste Befund war, daß auch bei einem völligen Ausfall der dnaB-Funktion für die bakterielle DNS-Replikation und die des Phagen λ bei 42°C die Replikation des P22Hy200 Genoms in E10 (dnaB70) und E16 (dnaB16) ablief. Trotz einer gleichartigen Organisation von P22 und λ gerade im Bereich der frühen Gene /35/ war P22Hy200 im Gegensatz zu λ in der Lage, sich in $dnaB_{ts}$-Mutanten bei nichtpermissiver Temperatur zu vermehren. Weitere Untersuchungen zeigten, daß dies auch für alle anderen getesteten $dnaB_{ts}$-Mutanten zutraf: in drei weiteren $dnaB_{ts}$-Mutanten vom Typ 1 (Elongationstyp, λ Vermehrung nur bei 28°C), in 4 Mutanten vom

Typ 2 (Elongationscharakter, weder bei 28°C noch bei 42°C λ Vermehrung), der einzigen Mutante vom Typ 3 (Initiationstyp, λ Vermehrung bei 28°C und 42°C) und in den drei Zuständen der Typ 4-Mutante (dnaB266am, supF, phänotypisch Wildtyp, also thermoresistent; dnaB266am, supE, thermosensitiv; dnaB266am, su⁻, P1bac) vermehrte sich P22Hy200 bei 42°C. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht, die Ursache dieses Verhaltens zu finden. Der Vergleich mit anderen Phagensystemen lieferte dazu einige Versuchsansätze.

Unabhängigkeit vom dnaB-Protein des bakteriellen Wirts findet man bei einigen kleinen, isometrischen Phagen mit einzelsträngiger DNS. Die DNS dieser Phagen hat ein Molekulargewicht von 1.7 - 2 x 10^6 D und enthält ca. 9 Genorte /104, 105/. Diese Phagen zerfallen bezüglich ihrer Bedürfnisse an bakteriellen Replikationsenzymen in zwei Gruppen /64/. Zur Gruppe I gehören ΦX174 und G4, zur Gruppe II zählen St1, ΦK und α3. Betrachtet man die Abhängigkeit der Vertreter der Gruppe I vom dnaB-Genprodukt des Wirts, gliedern sich diese Phagen wieder in zwei Untergruppen: zwar brauchen beide, ΦX174 und G4, ein aktives dnaB-Genprodukt des Bakteriums, um Nachkommen zu produzieren; bei ΦX174 ist aber sowohl die Umwandlung der einzelsträngigen DNS (SS) in die doppelsträngige replikative Form (RF), als auch die weitere Replikation dieser RF vom bakteriellen dnaB-Protein abhängig /58, 59, 100,101/. G4 dagegen benötigt erst bei der Replikation der RF ein aktives dnaB-Produkt des Wirts /65, 66, 102, 103/. Bei den Vertretern der Gruppe II, St1, ΦK und α3, sind alle Stadien der DNS-Replikation unabhängig vom bakteriellen dnaB-Genprodukt /64, 67/. Diese Phagen codieren aber für die gleiche Zahl Gene wie die Vertreter der Gruppe I /105/. Es scheint daher unwahrscheinlich, daß diese kleinen Phagen ein eigenes dnaB-analoges Protein besitzen. Hier scheint eher eine völlige Nichtbeteiligung des bakteriellen dnaB-Proteins oder eines analogen Phagenproteins am Replikationsablauf vorzuliegen. Ein solch einfacher Ablauf der DNS-Replikation von kleinen einzelsträngigen Phagen dürfte aber kaum auf die komplexeren Vorgänge der des doppelsträngigen, größeren Phagen P22 (28 x 10^6 D) übertragbar sein.

Unabhängigkeit vom bakteriellen dnaB-Genprodukt findet man auch bei sehr großen Phagen, wie T4 (116 x 10^6 D /135/) und P1 (60 x 10^6 D /106/), die eine große Zahl von Proteinen codieren. Der virulente Phage T4 exprimiert über 20 eigene Replikationsproteine, u.a. eine DNS-Polymerase und eine Ligase /107/. Bei P1, der im Prophagenzustand als autonomes Plasmid vorliegt /94/, wurde ein dnaB-Analog (ban) gefunden, das bei konstitutiver Exprimierung (bac-Mutanten) auch das bakterielle dnaB-Protein in sämtlichen Typen von $dnaB_{ts}$-Mutanten substituieren, bzw. stabilisieren kann /91/ und so die DNS-Replikation der $dnaB_{ts}$-Mutanten bei 42°C ermöglicht. In Anwesenheit des P1bac-Prophagen kann sogar der Phage λ in $dnaB_{ts}$-Mutanten des Typs 1 bei 42°C und in einem Teil der Typ 2-Mutanten bei 28°C wachsen /17/. Auch in der Umwandlung der einzelsträngigen ΦX174-DNS in die replikative Form im in-vitro-Test kann das P1 ban-Protein das dnaB-Genprodukt ersetzen /108, 125/. Das ban-Protein des Phagen P1 kann also in drei anderen Systemen zumindest einen Teil der Funktionen

des bakteriellen dnaB-Proteins übernehmen. Die Isolierung eines thermosensiblen dnaB/ban-Komplexes aus $dnaB_{ts}$-Mutanten macht eine Stabilisierung des hitzegeschädigten dnaB-Proteins durch das ban-Genprodukt wahrscheinlich /90/.
Beim Phagen P1 wird dieses ban-Protein in geringer Stückzahl auch im Prophagenzustand exprimiert. Daher konnten konstitutive bac-Mutanten leicht durch spontane Mutation isoliert werden /17, 89/, die durch eine höhere Hitzeresistenz von P1-lysogenen $dnaB_{ts}$-Mutanten gegenüber alysogenen auffielen. Eine häufigere Hitzeresistenz P22Hy180-lysogener $dnaB_{ts}$-Mutanten analog zu P1 wurde aber nicht gefunden. Der Phage codiert also entweder kein dnaB-Analog oder im Prophagenzustand werden überhaupt keine Replikationsgene exprimiert, was die wahrscheinlichere Möglichkeit sein dürfte.
Eine Beteiligung des bakteriellen dnaB-Proteins an der DNS-Replikation des Phagen P22Hy200 konnte jedoch mit indirekten Methoden nachgewiesen werden: die Zahl der P22Hy200 Nachkommen, die in einer $dnaB_{ts}$-Mutante vom Typ 2 (E58) pro infizierter Zelle gebildet wird, war bei 41°C wesentlich geringer als bei 28°C oder 37°C, während im vergleichbaren Wildtyp diese Zahl kontinuierlich zunahm. Obwohl diese Typ 2-Mutante bei niedriger Temperatur normal wächst, bildet der Phage λ bei dieser Temperatur auf ihr keine Plaques. Das isolierte dnaB-Genprodukt dieses Stamms kann die Umwandlung der einzelsträngigen ΦX174-DNS in die RF nicht stimulieren. Eine Adsorption an ATP-Agarose, wie sie bei anderen dnaB-Genprodukten stattfindet, kann bei diesem dnaB-Protein nicht nachgewiesen werden. Identifizierbar ist das dnaB-Genprodukt dieser Mutante einzig durch die Reaktion mit dnaB-Antikörper /H.Schuster, persönliche Mitteilung/. Diese Befunde können durch ein stark verändertes dnaB-Molekül oder durch eine geringe Kopienzahl des dnaB-Genprodukts in der Zelle erklärt werden. Die um ca. 90% verringerte burst size des P22Hy200 in dieser Mutante beweist, daß das dnaB-Protein des Wirts in irgendeiner Form an der DNS-Replikation des Phagen beteiligt sein muß.
Eine Wechselwirkung eines P22 Proteins mit dem bakteriellen dnaB-Genprodukt wurde durch die Isolierung einer Phagenmutante mit amber-Charakter wahrscheinlich. (Aufgrund der amber-Mutationshäufigkeit des verwendeten Lysats ist das Auftreten von Doppelmutationen unwahrscheinlich, so daß vorerst davon ausgegangen werden kann, daß alle auftretenden phänotypischen Änderungen dieser Mutante durch die amber-Mutation verursacht sein können.) Diese Phagenmutante plattiert nur schlecht auf einer dnaB-Mutante vom Typ 2 bei 37°C und zeigt damit eine strengere Abhängigkeit vom aktiven dnaB-Genprodukt des Wirts als der Wildtypphage. Warum P22Hy200 trotz einer Beteiligung des bakteriellen dnaB-Proteins an der Phagen-DNS-Replikation in allen getesteten $dnaB_{ts}$-Mutanten bei 42°C wuchs, bleibt zunächst noch unklar.
Natürlich stellt sich hier sofort die Frage, welches Phagenprotein für die Wechselwirkung mit dem dnaB-Genprodukt des Wirts verantwortlich sein könnte. Kartierungsdaten über die Phagenmutanten sab47 und sab116 (sab für strenge Abhängigkeit von dnaB) liegen noch nicht vor. Greift man aber die Analogie zu λ auf, so kann geschlossen werden, welches Pro-

tein am ehesten dafür in Frage kommt.
Direkt beteiligt an der DNS-Replikation des Phagen λ sind seine Genprodukte O und P /96/. Das Protein O erkennt den origin der Replikation, der im linken Bereich des Gens O liegt. Dieser Bereich codiert für das NH_2-terminale Ende des Proteins O, das für die spezifische Wechselwirkung mit dem origin verantwortlich ist. Der Abschnitt des COOH-Endes des Proteins ist zuständig für die Wechselwirkung mit dem Genprodukt P /97/. Genetische Befunde sprechen dafür, daß dieses Protein P mit dem bakteriellen dnaB-Genprodukt interagiert: die λ Mutanten πA und πB, die auf dnaB-Mutanten des Typs 2 (groP) bei 28°C im Gegensatz zum Wildtyp λ wachsen, kartieren im Bereich des Gen P /16/. Auch andere Autoren beschreiben ein System, in dem λ Mutanten, sogenannte reg-Mutanten, die im Gen P kartieren, auf E. coli Stämmen mit grpA-Mutationen plattieren /87/. Da diese grpA-Mutationen im Bereich des dnaB-Gens kartieren, dürfte es sich hier um das gleiche System wie λπ/groP handeln. Analog zum λ Gen P wird in der Regel das Gen 12 von P22 betrachtet und käme daher in Frage als phagencodiertes Protein, das mit dem bakteriellen dnaB-Genprodukt wechselwirkt.
Um nun eine Vorstellung von der Art dieser Wechselwirkung des bakteriellen dnaB-Genprodukts mit einem Replikationsprotein des Phagen zu bekommen, muß auf die derzeit diskutierten Modelle für die Funktion des dnaB-Proteins in der DNS-Replikation eingegangen werden.
Das dnaB-Genprodukt scheint eine komplexe Rolle in den molekularen Ereignissen der DNS-Replikation zu spielen. Zum einen nimmt es teil an der chromosomalen Initiation (Typ 3) und wirkt an der Synthese einer origin-RNS noch vor der Aktion des dnaA-Genprodukts mit /92, 114/. Zum anderen ist es an der Elongation der DNS an der Replikationsgabel beteiligt /119/. Ein Modell für diese Funktion findet man in /117/. Nach diesem Modell bindet das dnaB-Protein unter Mitwirkung der Proteine i und n und des dnaC-Genprodukts /98, 115/ an die DNS und wird dort vom dnaG-Genprodukt (Primase) erkannt /115, 126/, das dann die RNS für die Okazaki-Fragmente synthetisiert /102, 103, 116/. Das dnaB-Protein bleibt an der DNS gebunden und wandert weiter, um dann erneut als Erkennungsstelle für die Primase zu dienen. Bei der Fortbewegung wird ATP verbraucht (ATPase-Aktivität des dnaB-Proteins /93/).
Dieses Modell basiert auf Ergebnissen, die in in-vitro-Replikationstests mit den Phagen ΦX174 und G4 erzielt wurden. Auch an anderer Stelle wird eine ähnliche Funktion des dnaB-Genprodukts diskutiert /118/. Der Bedarf von nur einem dnaB-Molekül pro DNS-Vorlage, das für eine effektive DNS-Replikation in diesen Tests genügt /117, 118/, ist ein wesenliches Argument für dieses Modell.
Die zentrale Rolle, die das dnaB-Genprodukt in der DNS-Replikation spielt, spiegelt sich auch darin wieder, daß eine Reihe von R-Plasmiden dnaB-Analoge zu codieren scheinen /130/ und andere Plasmide wie z.B. ColE1, RSF1030 oder pSC101 vom dnaB-Produkt des Wirts abhängig sind /131, 154/.
Das dnaB-Protein hat ein Molekulargewicht, je nach Publikation variierend, zwischen 48000 - 62000 D und liegt im nati-

ven Zustand als Multimer mit einem Molekulargewicht zwischen 250000 und 290000 D vor /90, 112, 113/. Der Komplex besteht aus mindestens vier /90, 112, 119/, eventuell auch sechs Monomeren /113/. Die berechnete Anzahl der Multimere pro Zelle differiert stark, je nach Stamm, der zur Isolierung benutzt wurde, zwischen 20 /112/ und 100 /120/. Bei der letzteren Angabe darf jedoch nicht außer acht gelassen werden, daß dieser Stamm eine dnaBamber-Mutation trägt, die durch den Suppressor supF zur Thermoresistenz supprimiert wird. Ein Einfluß dieses Genotyps auf die Menge des dnaB-Multimers ist sehr wahrscheinlich, da ein Stamm, der sich nur durch den Suppressor supE unterscheidet (und dadurch thermosensibel ist), nur 10 dnaB-Moleküle pro Zelle enthält /120/.
Diese Vorstellung von der Struktur und Funktion des dnaB-Proteins dient als Grundlage für die Modelle der Wechselwirkung zwischen Phagen-codierten Replikationsenzymen und dem bakteriellen dnaB-Protein. Die Isolierung eines dnaB/ban-Komplexes aus P1-lysogenen Zellen legen für diesen Phagen die Bildung eines Heteromultimers nahe. Das P1 ban-Protein hat ein Molekulargewicht von 56000 D und je nach Stamm variiert die Zusammensetzung des Heteromultimers zwischen einem molaren Verhältnis von dnaB:ban von 2.5 (dnaB266am, supF, P1bac) und 1.5 (dnaB266am, supE, P1bac) /90/. Die Stabilisierung von $dnaB_{ts}$-Molekülen durch das P1 ban-Protein könnte dann durch sterische Wechselwirkung erfolgen.
Die Wechselwirkung des Phagen λ mit dem bakteriellen dnaB-Protein ist schwieriger vorstellbar. Die geringe Größe des λ Genprodukts P - 23000 D /121/ bzw. 27000 D /122/ - gegenüber dem dnaB-Protein dürfte nur eine relativ instabile Bildung eines Heteromultimerkomplexes zulassen. Wahrscheinlicher ist in diesem Fall die Wechselwirkung zwischen dem λ Protein P mit einem dnaB-Homomultimer anzunehmen. Die Affinität der beiden Proteine zueinander ist allerdings genügend groß, um bei einer hohen Konzentration des λ Genproduktes P das dnaB-Genprodukt aus dem Zellpool abzuziehen und die Erfüllung seiner Funktionen in anderen Systemen zu beeinträchtigen. So hemmt die Zugabe von λ Protein P zu einem in-vitro-Ansatz die dnaB-abhängige Konversion der ΦX174 Einzelstrang-DNS in die replikative Form /S.Wickner, zitiert in 123/, was auf eine Komplexbildung des Genproduktes P mit dnaB-Protein hindeutet /S.Wickner, zitiert in 159/. Eine Überproduktion von λ P-Protein in E. coli Zellen führt sogar zu einer langsamen Abschaltung der bakteriellen DNS-Replikation /123/.
Für eine Wechselwirkung zwischen λ P-Protein und dnaB-Genprodukt des Wirts sprechen auch noch andere Befunde: Während der Phage λ in der nur durch das dnaB-Analog von P1 (ban-Protein) supprimierten dnaBamber-Mutante nicht plattiert, wurden von λ wieder Plaques gebildet, wenn dieser Bakterienstamm lysogen für den Phagen P1bac crr war /111/. Der Phage P1bac crr produziert ungefähr die sechsfache Menge ban-Protein gegenüber P1bac /110/ und das Unvermögen von λ auf dem dnaBamber(P1bac)-Stamm zu wachsen, wäre damit auf eine zu geringe Konzentration an dnaB- bzw.dnaB-analogem Protein zurückzuführen. Auch biochemisch scheint sich das λ P-Protein in einem Komplex mit dnaB-Genprodukt zusammen nachweisen zu

lassen /A.Klein, E.Lanka, H.Schuster, zitiert in 123/, jedoch ist dieser Komplex schwierig zu isolieren /H.Schuster, persönliche Mitteilung/.
Zu erklären bliebe noch das Verhalten von λ und λπ-Mutanten auf dnaB-Mutanten mit groP-Charakter (Typ 2). Zumindest in einigen dieser Stämme steht entweder eine wesentlich geringere Menge an zellulärem dnaB-Protein zur Verfügung, oder die ATPase-Aktivität des dnaB-Genprodukts ist stark verändert /H.Schuster, persönliche Mitteilung/. Das Unvermögen des Wildtypphagen λ auf diesen Stämmen zu plattieren (auch bei niedriger Temperatur) kann durch beide Möglichkeiten verursacht werden. Bei den λπ-Mutanten könnte eine erhöhte Affinität des mutierten P-Genprodukts, resultierend in einer stärkeren Bindung des P-Proteins an das dnaB-Multimer, in beiden Fällen verantwortlich für das Verhalten dieser Mutanten auf groP-Stämmen sein. Bei einer geringeren Zahl bakterieller dnaB-Proteine pro Zelle würden durch eine höhere Affinität des mutierten P-Proteins zum dnaB-Homomultimer noch genügend dnaB/P-Komplexe entstehen können. Bei einer veränderten ATPase-Aktivität könnte eine festere Bindung im Komplex das Verweilen des dnaB-Multimers auf der Phagen-DNS erleichtern, oder ein Teil dieser Funktion in verstärktem Maß vom Phagenprotein übernommen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Vorstellungen und Befunde konnte ein Modell entworfen werden, das das Verhalten von P22 bzw. P22Hy200 in $dnaB_{ts}$-Mutanten erklären kann. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, daß für das Genprodukt 12 von P22 Molekulargewichte von 50000 - 54000 D gefunden wurden /121, 124/. Dieses Genprodukt ist also größer als das P-Protein, das bei λ analoge Funktionen ausübt, und liegt im Bereich des ban-Proteins von P1 und der Größe des bakteriellen dnaB-Monomers. Eine Wechselwirkung zwischen dem Protein 12 von P22 mit dem bakteriellen dnaB-Genprodukt könnte also durchaus als Bildung eines Heteromultimerkomplexes ablaufen, in dem analog zu P1 dnaB-Monomere durch das P22 Protein 12 ersetzt sind. In einem solchen Komplex wäre eine Stabilisierung der hitzegeschädigten $dnaB_{ts}$-Moleküle des Wirts, so wie sie für $dnaB_{ts}$/ban-Komplexe gezeigt wurde, denkbar. Dies würde erklären, warum P22Hy200 in allen getesteten $dnaB_{ts}$-Mutanten repliziert wurde. Beobachtungen bei P1 zeigen, daß das Ausmaß einer solchen Reaktivierung thermosensibler Proteine weitgehend abhängig von der Schwere des Defekts ist /17, 90, 110/. So könnte die stark verringerte burst size von P22Hy200 in einer groP-Mutante bei 41°C auf eine schlechte Reaktivierung im dnaB/12-Komplex zurückzuführen sein.
Auch das Verhalten der beiden isolierten P22Hy200 sab-Mutanten kann anhand dieser Modellvorstellung interpretiert werden. Das λπB-ähnliche Bild der Mutante sab47 (etwas geringere eop und wesentlich kleinere Plaques auf einem groP-Stamm) könnte erklärt werden mit einer verminderten Affinität zwischen dem mutierten Genprodukt 12 und den dnaB-Monomeren im Heteromultimerkomplex. Wenn gleichzeitig auch das bakterielle dnaB-Genprodukt quantitativ oder qualitativ verändert ist, so führt dies zu einer umso stärkeren Beeinträchtigung

der Phagen-DNS-Replikation. Die Phagenmutante sab116, die bereits auf einem E. coli Wildtypstamm (E74) sehr kleine und auf der groP-Mutante (E73) nur unter optimalen Bedingungen verschwindend kleine Plaques bildet, wäre dann auf einen sehr gravierenden Defekt im Genprodukt 12 zurückzuführen.
Keine der beiden sab-Mutanten zeigt einen völligen Ausfall der DNS-Replikation auf dem groP-Stamm. Liegt tatsächlich ein dnaB/12-Heteromultimerkomplex vor, so würde dies darauf hindeuten, daß die Bindung zwischen Genprodukt 12 des P22 und den dnaB-Monomeren so gut ist, daß eine Veränderung des Proteins 12 stets auch eine Verschlechterung der Funktion des Komplexes mit Wildtyp-dnaB-Protein führt und sehr starke Defekte daher auch in Wildtypwirtszellen letal wären. Auf einen engen Spielraum für eine funktionsfähige dnaB/12-Bindung weist die geringe Häufigkeit der sab-Mutanten (9×10^{-5}) und die Temperatursensibilität beider sab-Mutanten hin. Auch die Kältesensibilität der sab116-Mutante wäre zu erklären mit einer Konformationsänderung des mutierten Proteins bei niedriger Temperatur, die zu einer starken Verringerung der Komplexierungsfähigkeit mit dem dnaB-Protein führt.
Dieses Modell impliziert, daß irgendeine $dnaB_{ts}$-Mutante gefunden werden könnte, in der das $dnaB_{ts}$-Genprodukt bei hoher Temperatur so geschädigt ist, daß es durch das Phagenprotein nicht mehr stabilisiert werden kann und der Phage in dieser Mutante bei hoher Temperatur nicht mehr wächst. Die Tatsache, daß unter den elf in dieser Arbeit getesteten $dnaB_{ts}$-Mutanten keine diese Bedingung erfüllte, widerspricht diesem Modell keineswegs. Die $dnaB_{ts}$-Mutanten, in denen in dieser Arbeit die Vermehrungsfähigkeit des P22Hy200 bei 42°C geprüft wurde, stellen bei weitem nicht die Gesamtheit der beschriebenen $dnaB_{ts}$-Mutanten dar. Es ist nicht auszuschließen, daß keine der hier getesteten $dnaB_{ts}$-Mutanten eine Mutation genau im aktiven Zentrum des Proteins trägt. Gerade in zwei $dnaB_{ts}$-Mutanten mit einem möglicherweise sehr schweren Defekt konnte das Verhalten des Phagen aufgrund der Schwierigkeiten in der Anzucht dieser beiden Stämme noch nicht bei nichtpermissiver Temperatur getestet werden. Es ist nicht ausgeschlossen, daß sich P22Hy200 in diesen Mutanten bei 42°C nicht mehr vermehren kann.
Auch ein anderes P22-typisches Phänomen könnte mit dem hier diskutierten Modell erklärt werden: die Abschaltung der bakteriellen DNS-Replikation nach der Infektion mit P22 /20, 22, 34/ kann auf dem Abfangen des dnaB-Genprodukts durch eine starke Bindung mit dem Protein 12 des Phagen P22 beruhen, wodurch es für das bakterielle DNS-Substrat nicht mehr zur Verfügung steht.
In diesem Zusammenhang muß auch das Verhalten von P22 in einer neu isolierten Salmonella dna_{ts}-Mutante /127/ diskutiert werden. Diese Mutante könnte nach den Kotransduktionsdaten mit P1 (10% mit malB) eine $dnaB_{ts}$-Mutante sein. Sie zeigt eine DNS-Replikationsabschaltkinetik intermediär zwischen einem Initiations- und einem Elongationstyp, und die DNS des Phagen P22 wird in dieser Mutante nicht repliziert. Die dna_{ts}-Mutation ist nicht mit dem Phagen P1bac supprimierbar, wie dies bei allen E. coli $dnaB_{ts}$-Mutanten der Fall

ist /127/. Betrifft diese S. typhimurium dna_{ts}-Mutante wirklich eine dnaB-Funktion, könnte im Zusammenhang mit den hier diskutierten Modellen eine Mutation genau im aktiven Zentrum des Proteins und eventuell eine geänderte Protein/Protein-Wechselwirkung gegenüber der mit dem E. coli dnaB-Genprodukt vorliegen. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß diese S. typhimurium dna_{ts}-Mutante nicht eine Mutation im dnaB-Gen trägt, sondern defekt im DNA binding protein (ssb) ist. Diese Mutation wurde erst kürzlich in der gleichen Region (91 min) kartiert /128/. Nach den DNS-Replikationsmodellen ist dieses Protein zur Stabilisierung der einzelsträngigen DNS-Bereiche an der Replikationsgabel notwendig /117/, so daß seine aktive Funktion für jedes DNS-Replikationssystem essentiell sein müßte.
Sollte sich die S. typhimurium dna_{ts}-Mutante als dnaB-Mutante bestätigen, so wirft das unterschiedliche Verhalten von P22 in den $dnaB_{ts}$-Mutanten der beiden Spezies die Frage auf, inwieweit überhaupt von den Ergebnissen in E. coli Rückschlüsse auf die Bedürfnisse des Salmonella Phagen P22 an dna-Funktionen des natürlichen Wirts gezogen werden dürfen. Da aber sogar eine Funktion wie dnaA, die wahrscheinlich stark spezifisch für die Initiation des eigenen Systems ist, in E. coli durch das von S. typhimurium codierte dnaA-Produkt komplementierbar ist /129/, dürften beide Systeme genügend kompatibel sein. Ein Unterschied im Verhalten des P22 in $dnaB_{ts}$-Mutanten von E. coli und S. typhimurium bestünde auch nur insofern, als eine Unabhängigkeit der P22-DNS-Replikation vom E. coli dnaB-Protein vorgetäuscht wird, während in S. typhimurium die Abhängigkeit von diesem Genprodukt eindeutig nachweisbar wäre (falls die S. typhimurium dna_{ts}-Mutation wirklich im dnaB-Gen liegt).

Eindeutige Beweise für die hier postulierte Art der Wechselwirkung des Genproduktes 12 von P22 mit dem dnaB-Genprodukt des Wirts stehen natürlich noch aus. Die Konstruktion eines Plasmids mit den P22 Replikationsgenen könnte in diesem Zusammenhang lohnend sein. Ebenso könnte die Herstellung und Untersuchung mehrerer S. typhimurium $dnaB_{ts}$-Mutanten, eventuell mit einem groP-ähnlichen Charakter, durch lokalisierte Mutagenese weitere Ansatzpunkte zur Klärung der DNS Replikation des P22 in $dnaB_{ts}$-Mutanten beitragen. Auch die Ausarbeitung von in-vitro-DNS-Replikationstests mit S. typhimurium Extrakten könnte einige Aspekte dieser Phagen-Wirtsbeziehung klären.

5. Zusammenfassung

(1) E. coli dna_{ts}-Mutanten wurden mit dem Salmonella Phagen P22 mit Hilfe der F-Duktion lysogenisiert. Der Phage wurde in diesen Stämmen durch Bestrahlung mit UV-Licht induziert und die Phagenproduktion bei 38°C getestet. P22 vermehrte sich in der Initiationsmutante E2 (dnaA), aber nicht in den Elongationsmutanten E6 (dnaE) und E21 (dnaG). In zwei $dnaB_{ts}$-Elongationsmutanten, E10 (dnaB70) und E16 (dnaB43), wurden bei 38°C Phagen produziert. Eine Pulsmarkierung mit ^{3}H-Thymidin zeigte, daß in diesen beiden Mutanten die bakterielle DNS-Syntheße bei 42°C sofort abgeschaltet wurde, bei 38°C jedoch eine restliche DNS-Synthese stattfand (40% bzw. 49% des vergleichbaren Werts bei 28°C). UV-Induktionsversuche in diesen beiden Stämmen mit dem E. coli Phagen λ, der auf eine aktive dnaB-Funktion des Wirts angewiesen ist, verliefen bei 38°C nicht eindeutig.

(2) Ein λ/P22-Hybridphage wurde konstruiert, der nach genetischer Analyse und dem "physical mapping" mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII die Gene der morphogenetischen Proteine und Hüllkomponenten von λ und von P22 die Region der frühen Gene 24 (analog zu λ N) bis einschließlich 23 (analog zu λ Q) enthält. Mit diesem Hybridphagen P22Hy180 (c^+), bzw. P22Hy200 (c^-) wurde die von P22 Genen gesteuerte DNS-Replikation nach normaler lytischer Infektion in E. coli dna_{ts}-Mutanten bei 42°C geprüft: bestätigt wurde die Abhängigkeit von den dnaE- und dnaG-Genprodukten des Wirts. In der Initiationsmutante E4 (dnaC) wuchs der Hybridphage, aber nicht in den Elongationsmutanten E22 (dnaZ) und E48 (lig). Bestätigt wurde das Wachstum in den beiden $dnaB_{ts}$-Mutanten.

(3) In 9 weiteren E. coli $dnaB_{ts}$-Mutanten aus allen 4 phänotypischen Kategorien vermehrte sich P22Hy200 ebenfalls bei 42°C. Die "burst size" in der Typ 2-Mutante E58 (groPB558) war bei 41°C drastisch reduziert gegenüber der im Wildtyp E57 bei gleicher Temperatur (um 93%) und der in der Mutante bei 37°C (um 89%). Zwei Phagenmutanten konnten isoliert werden, deren Vermehrungsfähigkeit in einer Typ 2-$dnaB_{ts}$-Mutante (E73, groPB585) bei 37°C stark beeinträchtigt war.

6. Literaturverzeichnis

/1/ Carl,P. (1970): E. coli mutants with temperature sensitive synthesis of DNA. Molec.gen.Genet. 109, 107-122.

/2/ Filip,C.C., Allen,J.S., Gustafson,R.A., Allen,R.G., Walker,J.R. (1974): Bacterial cell division regulation: Characterization of the dnaH locus of E. coli. J. Bacteriol. 119, 443-449.

/3/ Wada,Ch., Yura,T. (1974): Phenethyl alcohol resistence in E. coli. III. A temperature-sensitive mutation (dnaP) affecting DNA replication. Genetics 77, 199-220.

/4/ Inouye,M. (1969): Unlinking of cell division from DNA replication in a temperature-sensisitive DNA synthesis mutant of E. coli. J. Bacteriol. 99, 842-850.

/5/ Lanka,E., Schuster,H. (1970): Replication of bacteriophages in E. coli mutants thermosensitive in DNA synthesis. Molec.gen.Genet. 106, 274-285.

/6/ Hirota,Y., Gefter,M., Mindich,L. (1972): A mutant of E. coli defective in DNA polymerase II activity. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 3238-3242.

/7/ Gross,J.D. (1972): DNA replication in bacteria. Curr. Top.Microbiol.Immunol. 57, 39-73.

/8/ Hirota,Y., Mordoh,J., Jacob,F. (1970): On the process of cellular division in E. coli. III. Thermosensitive mutants of E. coli altered in the process of DNA initiation. J.Mol.Biol. 53, 369-387.

/9/ Wechsler,J.A. (1975): Genetic and phenotypic characterization of dnaC mutations. J. Bacteriol. 121, 594-599.

/10/ Schubach,W.H., Whitmer,J.D., Davern,C.I. (1973): Genetic control of DNA initation in E.coli. J.Mol.Biol. 74, 205-221.

/11/ Wolf,B. (1972): The characteristics and genetic map location of a temperature sensitive DNA mutant of E. coli K12. Genetics 72, 569-593.

/12/ Fangman,W.L., Novick,A. (1968): Characterization of two bacterial mutants with temperature-sensitive synthesis of DNA. Genetics 60, 1-17.

/13/ Hirota,Y., Ryter,A., Jacob,F. (1968): Thermosensitive mutants of E. coli affected in the process of DNA synthesis and cellular division. Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol. 33, 677-693.

/14/ Yochem,J., Uchida,H., Sunshine,M., Saito,H., Georgopoulos,C.P., Feiss,M. (1978): Genetic analysis of two genes, dnaJ and dnaK, neccessary for E. coli and bacteriophage lambda DNA replication. Molec.gen.Genet. 164, 9-14.

/15/ Beyersmann,D., Schlicht,M., Schuster,H. (1971): Temperature-sensitive initiation of DNA replication in a mutant of E. coli K12. Molec.gen.Genet. 111, 145-158.

/16/ Georgopoulos,C.P., Herskowitz,I. (1971): E. coli mutants blocked in lambda DNA synthesis. In: The bacteriophage lambda. A.D.Hershey (ed.), pp 553-564, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

/17/ D'Ari,R., Jaffe-Brachet,A., Touati-Schwartz,D., Yarmolinski,M.B. (1975): A dnaB analog specified by bacteriophage P1. J.Mol.Biol. 94, 341-366.

/18/ Kozinski,A.W., Szybalski,W. (1959): Dispersive transfer of the parental DNA molecule to the progeny of phage ΦX174. Virology 9, 260-274.

/19/ Bonhoeffer,F. (1966): DNA transfer and DNA synthesis during bacterial conjugation. Molec.gen.Genet. 98, 141-149.

/20/ Dopatka,H.D., Prell,H.H. (1973): Amber mutants of Salmonella-phage P22 in genes engaged in the establishment of lysogeny. Molec.gen.Genet. 120, 157-170.

/21/ Truitt,C.L., Walker,J.R. (1974): Growth of phages λ, ΦX174 and M13 requires the dnaZ (previously dnaH) gene produkt of E. coli. Biochem.biophys.Res.Commun. 61, 1036-1042.

/22/ Smith,H.O., Levine,M. (1964): Two sequential repressions of DNA synthesis in the establishment of lysogeny by phage P22 and its mutants. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 52, 356-363.

/23/ Hoffmann,B., Levine,M. (1975): Bacteriophage P22 virion protein which performs an essential early function. I. Analysis of 16⁻ts mutants. J. Virol. 16, 1536-1546.

/24/ Vinograd,J. (1963): Sedimentation equilibrium in a buoyant density gradient. In: Methods in Enzymology, Volume VI (S.P.Colowick and N.O.Kaplan, eds.), pp 854-870, Academic Press, New York & London.

/25/ Gottesman,M.E., Yarmolinski,M.B. (1968): Integration-negative mutants of bacteriophage lambda. J.Mol.Biol. 31, 487-505.

/26/ Bagdasarian,M., Zdzienicka,M., Bagdasarian,M. (1972): Temperature sensitive initiation of DNA synthesis in a mutant of Salmonella typhimurium. Molec.gen.Genet. 117, 129-142.

/27/ Spratt,B.G., Rowbury,R.J. (1970): A mutant in the initiation of DNA synthesis in Salmonella typhimurium. J.gen.Microbiol. 64, 127-138.

/28/ Benzinger,R., Kleber,I. (1971): Transfection of E. coli and Salmonella typhimurium spheroplasts: Host-controlled restriction of infective bacteriophage P22 DNA. J. Virol. 8, 197-202.

/29/ Henner,W.D., Kleber,I., Benzinger,R. (1973): Transfection of E. coli spheroplasts. III. Facilitation of transfection and stabilization of spheroplasts by different basic polymers. J. Virol. 12, 741-747.

/30/ Gemski,P., Baron,L.S., Yamamoto,N. (1972): Formation of hybrids between coliphage λ and Salmonella phage P22 with a Salmonella typhimurium hybrid sensitive to these phages. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 3110-3114.

/31/ Hoppe,I., Roth,J. (1974): Specialized transducing phages derived from Salmonella phage P22. Genetics 76, 633-654.

/32/ Israel,V. (1967): The production of inactive phage P22 particles following induction. Virology 33, 317-322.

/33/ Wechsler,J.A., Gross,J.D. (1971): E. coli mutants temperature-sensitive for DNA synthesis. Molec.gen.Genet. 113, 273-284.

/34/ Backhaus,H., Schmieger,H. (1979): Replication and maturation of phage P22 in a mutant of Salmonella typhimurium temperature sensitive in initiation of DNA replication. Molec.gen.Genet. 171, 295-299.

/35/ Susskind,M., Botstein,D. (1978): Molecular genetics of bacteriophage P22. Microbiol. Rev. 42, 385-413.

/36/ Botstein,D., Herskowitz,I. (1974): Properties of hybrids between Salmonella phage P22 and coliphage λ. Nature (London) 251, 584-589.

/37/ Hilliker,S., Botstein,D. (1976): Specificity of genetic elements controlling regulation of early functions in temperate bacteriophages. J.Mol.Biol. 106, 537-566.

/38/ Thomas,M., Davis,R.W. (1975): Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with EcoRI restriction endonuclease. J.Mol.Biol. 91, 315-328.

/39/ Jackson,E.N., Miller,H.I., Adams,M.L. (1978): EcoRI restriction endonuclease cleavage site map of bacteriophage P22 DNA. J.Mol.Biol. 118, 347-363.

/40/ Robinson,L.H., Landy,A. (1977): HindII, HindIII, and HpaI restriction fragment maps of bacteriophage λ DNA. Gene 2, 1-37.

/41/ Deans,R.J., Jackson,E.N. (1979): Restriction endonuclease HindIII cleavage site map of bacteriophage P22. Virology 95, 359-372.

/42/ Karamata,D., Gross,J.D. (1970): Isolation and genetic analysis of temperature-sensitive mutants of Bacillus subtilis defective in DNA synthesis. Molec.gen.Genet. 108, 277-287.

/43/ White,K., Sueoka,N. (1973): Temperature sensitive DNA synthesis mutants of Bacillus subtilis. Genetics 73, 185-214.

/44/ Attolini,C., Mazza,G., Fortunato,A., Ciarrocchi,G., Mastromei,G., Riva,S., Falaschi,A. (1976): On the identity of dnaP and dnaF genes of Bacillus subtilis. Molec.gen.Genet. 148, 9-17.

/45/ Love,E., D'Ambrosio,J., Brown,N.C. (1976): Mapping of the gene specifying DNA polymerase III of Bacillus subtilis. Molec.gen.Genet. 144, 313-321.

/46/ Bazill,G.W., Karamata,D. (1972): Temperature-sensitive mutants of Bacillus subtilis defective in DNA synthesis. Molec.gen.Genet. 117, 19-29.

/47/ Sevastopoulos,L.G., Wehr,C.T., Glaser,D.A. (1977): Large-scale automated isolation of E. coli mutants with thermosensitive DNA replication. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 3485-3489.

/48/ Wechsler,J.A., Nüsslein,V., Otto,B., Klein,A., Bonhoeffer,F., Herrmann,R., Gloger,L., Schaller,H. (1973): Isolation and characterization of thermosensitive E. coli mutants defective in DNA replication. J. Bacteriol. 113, 1381-1388.

/49/ Beyersmann,D., Messer,W., Schlicht,M. (1974): Mutants of E. coli B/r defective in DNA initiation: dnaI, a new gene for replication. J. Bacteriol. 118, 783-789.

/50/ Bachmann,B.J., Brooks Low,K., Taylor,A.L. (1976): Recalibrated linkage map of E. coli K12. Bacterio. Rev. 40, 116-167.

/51/ Sanderson,K.E., Hartman,Ph.E. (1978): Linkage map of Salmonella typhimurium, Edition V. Microbiol.Rev. 42, 471-519.

/52/ Zinder,N. (1960): Sexuality and mating in Salmonella. Science 131, 924-926.

/53/ Baron, L.S., Gemski,P., Johnson, E.M., Wohlhieter, J.A. (1968): Intergeneric bacterial matings. Bacteriol.Rev. 32, 362-369.

/54/ Smith,H.O., Levine,M. (1965): Gene order in prophage P22. Virology 27, 229-231.

/55/ Willets,N.S., Clark,A.J., Low,B. (1969): Genetic location of certain mutations conferring recombination deficiency in E. coli. J. Bacteriol. 97, 244-249.

/56/ McFadden,G., Denhardt,D.T. (1974): Mechanism of replication of ΦX174 single-stranded DNA. IX. Requirement for the E. coli dnaG protein. J. Virol. 14, 1070-1075.

/57/ Mannheimer,I., Truffaut,N. (1974): Growth of bacteriophage ΦX174 in E. coli strains carrying temperature-sensitive mutations for DNA initiation. Mol.gen.Genet. 130, 21-27.

/58/ Dumas,L.B., Miller,C.A. (1974): Inhibition of bacteriophage ΦX174 DNA replication in dnaB mutants of E. coli C. J.Virol. 14, 1369-1379.

/59/ Steinberg,R.A., Denhardt,D.T. (1968): Inhibition of synthesis of ΦX174 DNA in a mutant host thermosensitive for DNA synthesis. J.Mol.Biol. 37, 525-528.

/60/ Dumas,L.B., Miller,C.A. (1973): Replication of bacteriophage ΦX174 DNA in a temperature-sensitive dnaE mutant of E. coli C. J.Virol. 11, 848-855.

/61/ Kranias,E.G., Dumas,L.B. (1974): Replication of bacteriophage ΦX174 DNA in a temperature-sensitive dnaC mutant of E. coli C. J.Virol. 13, 146-154.

/62/ Taketo,A. (1973): Sensitivity of E. coli to viral nucleic acid. VI. Capacity of dna mutants and DNA polymerase-less mutants for multiplication of ΦA and ΦX174. Mol.gen.Genet. 122, 15-22.

/63/ Taketo,A. (1975): Replication of ΦA and ΦX174 in E. coli mutants thermosensitive in DNA synthesis. Mol.gen.Genet. 139, 285-291.

/64/ Dumas,L.B. (1978): Requirements for host gene products in replication of single-stranded phage DNA in vivo. In: Single-stranded DNA phages. D.T.Denhardt, D.Dressler, D.S.Ray (eds.), pp.341-359, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

/65/ Derstine,P.L., Dumas,L.B., Miller,C.A. (1976): Bacteriophage G4 DNA synthesis in temperature-sensitive dna mutants of E. coli. J.Virol. 19, 915-924.

/66/ Kodaira,K.-I., Taketo,A. (1977): Conversion of bacteriophage G4 single-stranded viral DNA to double-stranded replicative form in dna mutants of E. coli. Biochim.Biophys.Acta 476, 149-155.

/67/ Taketo,A. (1976): Host genes involved in the replication of single-stranded DNA phage ΦK. Mol.gen.Genet. 148, 25-29.

/68/ Taketo,A., Kodaira,K.-I. (1978): Growth of single-stranded DNA phages in replication mutants of E. coli. Mol.gen.Genet. 162, 151-155.

/69/ Jacob,F., Adelberg,E.A. (1959): Transfert de caractères genetiques par incorporation au facteur sexuel d'E. coli. Compt.Rend.Acad.Sci. 249, 189-191.

/70/ Richter,A. (1957): Complementary determinants on an Hfr phenotype in E. coli K-12. Genetics, 42, 391.

/71/ Low,K.B. (1972): E. coli K-12 F-prime factors, old and new. Bacteriol.Rev. 36, 587-607.

/72/ Moody,E.E.M., Hayes,W. (1972): Chromosome transfer by autonomous transmissible plasmids: the role of the bacterial recombination (rec) system. J. Bacteriol. 111, 80-85.

/73/ Hilliker,S., Botstein,D. (1975): An early regulatory gene of Salmonella phage P22 analogous to gene N of coliphage λ. Virology 68, 510-524.

/74/ Botstein,D., Levine,M. (1968): Synthesis and maturation of phage P22. II. Properties of temperature-sensitive phage mutants defective in DNA metabolism. J.Mol.Biol. 34, 643-654.

/75/ Levine,M., Schott,C. (1971): Mutations of phage P22 affecting phage DNA synthesis and lysogenization. J.Mol.Biol. 62, 53-64.

/76/ Botstein,D., Chan,R.K., Waddell,C.H. (1972): Genetics of bacteriophage P22. II. Gene order and gene function. Virology 49, 268-282.

/77/ Skalka,A., Hanson,P. (1972): Comparisons of the distribution of nucleotides and common sequences in DNA from selected bacteriophages. J.Virol. 9, 583-593.

/78/ Georgopoulos,C.P. (1977): A new bacterial gene (groPC) which affects λ DNA replication. Mol.gen.Genet. 151, 35-39.

/79/ Friedman,D.I., Baron,L.S. (1974): Genetic characterization of a bacterial locus involved in the activity of the N function of phage λ. Virology 58, 141-148.

/80/ Franklin,N.C., Yanofsky,C. (19): The N protein of λ: Evidence bearing on transcription termination, polarity and the alteration of E. coli RNA polymerase. In: RNA Polymerase. R.Losick, M.Chamberlain (eds.), pp. 693-706, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

/81/ Friedman,D.I., Jolly,C.T., Mural,R.J. (1973): Interference with the expression of the N gene function of phage λ in a mutant of E. coli. Virology 51, 216-226.

/82/ Roberts,R.J. (1977): Restriction endonucleases. 1. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. In: DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes. A.I.Bukhari, J.A.Shapiro, S.L.Adhya (eds) pp. 757-768, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

/83/ Hedgpeth,J., Goodman,H.M., Boyer,H.W. (1972): DNA nucleotide sequence restricted by the RI endonuclease. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 3449-3452.

/84/ Old,R., Murray,K., Roizes,G. (1975): Recognition sequence of restriction endonucleaseIII from Hemophilus influenzae. J.Mol.Biol. 92, 331-339.

/85/ Echols,H., Murialdo,H. (1978): Genetic map of bacteriophage lambda. Microbiol.Rev. 42, 577-591.

/86/ Davidson,N., Szybalski,W. (1971): Physical and chemical characteristics of lambda DNA. In: The Bacteriophage Lambda. A.D.Hershey (ed.), pp.45-82, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

/87/ Saito,H., Uchida,H. (1977): Initiation of the DNA replication of bacteriophage lambda in E. coli K12. J.Mol.Biol. 113, 1-25.

/88/ Furth, M.E., Blattner, F.R., McLeester, C., Dove, W.F. (1977): Genetic structure of the replication origin of bacteriophage lambda. Science 198, 1046-1051.

/89/ Ogawa,T. (1975): Analysis of the dnaB function of E. coli K12 and the dnaB-like function of P1 prophage. J.Mol.Biol. 94, 327-340.

/90/ Lanka, E., Mikolajczyk, M., Schlicht, M., Schuster, H. (1978): Association of the prophage P1 ban protein with the dnaB protein of E. coli. J.Biol.Chem. 253, 4746-4753.

/91/ Lanka, E., Schlicht, M., Mikolajczyk, M., Geschke, B., Edelbluth,C., Schuster,H. (1978): Suppression of E. coli dnaB mutants by prophage P1bac: a biochemical approach. In: DNA Synthesis: Present and Future. I.Molineux and M.Kohiyama (eds.), pp.669-682, Plenum Press, New York.

/92/ Zyskind,J.W., Smith,D.W. (1977): Novel E. coli dnaB mutant: direct involvement of the dnaB252 gene product in the synthesis of an origin-ribonucleic acid species during initiation of a round of DNA replication. J.Bacteriol. 129, 1476-1486.

/93/ Wickner,S., Wright,M., Hurwitz,J. (1974): Association of a DNA-dependent and independent ribonucleosid triphosphatase activities with dnaB gene product of E.coli Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 783-787.

/94/ Ikeda,H., Tomizawa,J.-I. (1968): Prophage P1, an extra-chromosomal replication unit. Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol. 33, 791-798.

/95/ Herskowitz,J. (1973): Controll of gene expression in bacteriophage lambda. Ann.Rev.Genet. 7, 289-324.

/96/ Skalka,A.M. (1977): DNA replication - bacteriophage lambda. Curr.Top.Microbiol.Immumol. 78, 201-237.

/97/ Furth,M.E., McLeester,C., Dove,W.F. (1978): Specificity determinants for bacteriophage lambda DNA replication. I. A chain of interactions that controls the initiation of replication. J.Mol.Biol. 126, 195-225.

/98/ Wickner,S., Hurwitz,J. (1975): Interaction of E. coli dnaB and dnaC(D) gene products in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 921-925.

/99/ Rowen,L., Kornberg,A. (1978): Primase, the dnaG protein of E. coli. An enzyme which starts DNA chains. J.Biol.Chem. 253, 758-764.

/100/ Wickner,S., Hurwitz,J. (1974): Conversion of ΦX174 viral DNA to double-stranded form by purified E. coli proteins. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 4120-4124.

/101/ Schekman, R., Weiner, J.H., Weiner, A., Kornberg, A. (1975): Ten proteins required for conversion of ΦX174 single-stranded DNA to duplex form in vitro. Resolution and reconstitution. J.Biol.Chem. 250, 5859-5865.

/102/ Wickner,S. (1977): DNA or RNA priming of bacteriophage G4 DNA synthesis by E. coli dnaG protein. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 2815-2819.

/103/ Zechel,K., Bouche,J.-P., Kornberg,A. (1975): Replication of phage G4. A novel and simple system for initiation of DNA synthesis. J.Biol.Chem. 250, 4684-4689.

/104/ Tessman,E.S., Tessman,I. (1978): The genes of the isometric phages and their functions. In: Single Stranded DNA Phages. D.T.Denhardt, D.Dressler, D.S.Ray (eds.), pp 9-29, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

/105/ Godson,N.G. (1978): The other isometric phages. In: Single Stranded DNA Phages. D.T.Denhardt, D.Dressler, D.S.Ray (eds.), pp 103-112, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

/106/ Ikeda,H., Tomizawa,J.-I. (1965): Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. I. Molecular origin of the fragments. J.Mol.Biol. 14, 85-109.

/107/ Wood,W.B. (1974): Genetic map of bacteriophage T4. In: Handbook of genetics, Vol.I. R.C.King (ed.), pp 327-331, Van Nostrand Reinhold, New York.

/108/ Lanka,E., Geschke,B., Schuster,H. (1978): E. coli dnaB mutant defective in DNA initiation: Isolation and properties of the dnaB protein. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 799-803.

/109/ Thomas,C.A., Abelson,J. (1966): The isolation and characterization of DNA from bacteriophage. In: Procedures in Nucleic Acid Research. G.L.Cantoni, D.R.Davies (eds.), pp 553-561, Harper and Row, New York.

/110/ Edelbluth,C., Lanka,E., von der Hude,W., Mikolajczyk, M., Schuster,H. (1979): Association of the prophage P1 ban protein with the dnaB protein of E. coli. Overproduction of ban protein by a P1 bac crr mutant. Eur.J.Biochem. 94, 427-435.

/111/ Touati-Schwartz,D. (1978): Two replication functions in phage P1: ban, an analog of dnaB, and bof, involved in the control of replication. In: DNA Synthesis: Present and Future. I. Molineux and M. Kohiyama (eds.), pp 683-692, Plenum Press, New York.

/112/ Ueda,K., McMacken,R., Kornberg,A. (1978): dnaB protein of E. coli. Purification and role in the replication of IX174 DNA. J.Biol.Chem. 253, 261-269.

/113/ Reha-Krantz,L.J., Hurwitz,J. (1978): The dnaB protein of E. coli. I. Purification, homogeneity, and physical properties. J.Biol.Chem. 253, 4043-4050.

/114/ Zyskind,J.W., Deen,L.T., Smith,D.W. (1977): Temporal sequence of events during the initiation process in E. coli DNA replication: roles of the dnaA and dnaC gene products and RNA polymerase. J. Bacteriol. 129, 1466-1475

/115/ Weiner,J.H., McMacken,R., Kornberg,A. (1976): Isolation of an intermediate which precedes dnaG RNA polymerase participation in enzymatic replication of bacteriophage ΦX174 DNA. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 752-756.

/116/ Bouche,J.P., Zechel,K., Kornberg,A. (1975): dnaG gene product, a rifampicin-resistant RNA polymerase, initiates the conversion of a single-stranded coliphage DNA to its duplex replicative form. J.Biol.Chem. 250, 5995-6001.

/117/ McMacken,R., Ueda,K., Kornberg,A. (1977): Migration of E. coli dnaB protein on the template DNA strand as a mechanism in initiating DNA replication. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 190-4194.

/118/ Reha-Krantz,L.J., Hurwitz,J. (1978): The dnaB gene product of E. coli. II. Single stranded DNA-dependent ribonucleoside triphosphatase activity. J.Biol.Chem. 253, 4051-4057.

/119/ Lark,K.G., Wechsler,J.A. (1975): DNA replication in dnaB mutants of E. coli: gene product interaction and synthesis of 4S pieces. J.Mol.Biol. 92, 145-163.

/120/ Lanka, E., Edelbluth, C., Schlicht, M., Schuster, H. (1978): E. coli dnaB protein. Affinity chromatography on immobilized nucleotides. J.Biol.Chem. 253, 5847-5851.

/121/ Oppenheim,A., Katzir,N., Oppenheim,A. (1977): The product of gene P of coliphage λ. Virology 79, 437-441.

/122/ Raab, C., Klein, A., Kluding, H., Hirth, P., Fuchs, E. (1977): Cell free synthesis of bacteriophage lambda replication proteins. FEBS Letters 80, 275-278.

/123/ Klinkert,J., Klein,A. (1979): Cloning of the replication gene P of bacteriophage lambda: effects of increased P-protein synthesis on cellular and phage DNA replication. Molec.gen.Genet. 171, 219-227.

/124/ Lew,K., Casjens,S. (1975): Identification of early proteins coded by bacteriophage P22. Virology 68, 525-533.

/125/ Schuster,H., Mikolajczyk,M., Rohrschneider,J., Geschke,B. (1975): ΦX174 DNA-dependent DNA synthesis in vitro: requirement for P1 ban protein in dnaB mutant extracts of E. coli. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 3907-3911.

/126/ McMacken,R., Kornberg,A. (1978): A multienzyme system for priming the replication of ΦX174 viral DNA. J.Biol.Chem. 253, 3313-3319.

/127/ Schwarz,W. (1979): Mutanten von Salmonella typhimurium mit temperatursensiblem DNS-Stoffwechsel. Dissertation 1979, Ludwig-Maximiliansuniversität, München.

/128/ Meyer,R.R., Glassberg,J., Kornberg,A. (1979): An E. coli mutant defective in single-strand binding protein is defective in DNA replication. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 1702-1705.

/129/ Joh,K., Hiraga,S. (1979): Genetic mapping of the chromosomal replication origin of Salmonella typhimurium. J.Bacteriol. 138, im Druck.

/130/ Wang,P.Y., Iyer,V.N. (1978): Analogs of the dnaB gene of E. coli K-12 associated with conjugative R plasmids. J.Bacteriol. 134, 765-770.

/131/ Staudenbauer,W.L., Lanka,E., Schuster,H. (1978): Replication of small plasmids in extracts of E. coli. Involvement of the dnaB and dnaC protein in the replication of early replicative intermediates. Molec.gen.Genet. 162, 243-249.

/132/ Watson,J.D., Crick,F.H.C. (1953): A structure of deoxyribose nucleic acid. Nature 171, 737-738.

/133/ Veomett,G.E., Kuempel,P.L. (1973): Strand-specific DNA degradation in a mutant of E. coli. Molec.gen.Genet. 123, 17-28.

/134/ Fuchs,J.A., Karlström,H.O., Warner,H.R., Reichard,P. (1972): Defective gene product in a dnaF mutant of E. coli. Nature N.Biol. 238, 69-71.

/135/ Kim,J.S., Davidson,N. (1974): Electron microscope heteroduplex study of sequence relations of T2, T4, and T6 bacteriophage DNAs. Virology 57, 93-111.

/136/ Nüsslein, V., Otto, B., Bonhoeffer, F., Schaller, H. (1971): Function of DNA polymerase III in DNA replication. Nature N.Biol. 234, 285-286.

/137/ Gefter,M.L., Hirota,Y., Kornberg,T., Wechsler,J.A., Barnoux,C. (1971): Analysis of DNA polymerases II and III in mutants of E. coli thermosensitive for DNA synthesis. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 68, 3150-3153.

/138/ Lark,K.G. (1972): Genetic control over the initiation of the synthesis of short deoxyribonucleotide chains in E. coli. Nature N.Biol. 240, 237-240.

/139/ Horiuchi,T., Maki,H., Sekiguchi,M. (1978): A new conditional lethal mutator (dnaQ49) in E. coli K12. Molec.gen.Genet. 163, 277-283.

/140/ Backhaus,H., Schmieger,H. (1974): The origin of the DNA in a special class of generalized transducing particles of Salmonella-phage P22. Molec.gen.Genet. 131, 123-135.

/141/ Jacob,F., Brenner,S., Cuzin,F. (1963): On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 329-348.

/142/ Rowen,L., Kornberg,A. (1978): A ribo-deoxyribonucleotide primer synthesized by primase. J.Biol.Chem. 253, 770-774.

/143/ McHenry,Ch.S., Crow,W. (1979): DNA polymerase III of E. coli. J.Biol.Chem. 254, 1748-1753.

/144/ Wickner,S., Hurwitz,J. (1976): Involvement of E. coli dnaZ gene product in DNA elongation in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 1053-1057.

/145/ Wickner,S. (1976): Mechanism of DNA elongation catalyzed by E. coli DNA polymerase III, dnaZ protein and DNA elongation factors I and III.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 3511-3515.

/146/ Lark,K.G. (1972): Evidence for the direct involvement of RNA in the initiation of DNA replication in E. coli 15T⁻. J.Mol.Biol. 64, 47-60.

/147/ Messer,W. (1972): Initiation of DNA replication in E. coli B/r: chronolgy of events and transcriptional control of initiation. J.Bacteriol. 112, 7-12.

/148/ Gottesman,M.M., Hicks,M.L., Gellert,M.G. (1973): Genetics and function of DNA ligase in E. coli.
J.Mol.Biol. 77, 531-547.

/149/ Konrad,E.B., Modrich,P., Lehman,I.R. (1973): Genetic and enzymatic characterization of a conditional lethal mutant of E. coli K12 with a temperature-sensitive DNA ligase. J.Mol.Biol. 77, 519-529.

/150/ Geider,K. (1976): Molecular aspects of DNA replication in E. coli systems. Curr.Top.Micribiol.Immunol. 74, 55-112.

/151/ Baas, P.D., Jansz,H.S., Sinsheimer,R.L. (1976): Bacteriophage ΦX174 DNA synthesis in a replication-deficient host: Determination of the origin of ΦX DNA replication. J.Mol.Biol. 102, 633-656.

/152/ Marsh,R.C. (1978): Map location of the E. coli origin of replication. Molec.gen.Genet. 166, 299-304.

/153/ Godson, G.N., Fiddes, J.C., Barrell, B.G., Sanger, F. (1978): Comparative DNA sequence analysis of the G4 and ΦX174 genoms. In: Single Stranded DNA Phages. D.T.Denhardt, D.Dressler , D.S.Ray (eds.), pp 51-86, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

/154/ Hasunuma,K., Sekiguchi,M. (1979): Effect of dna mutations on the replication of plasmid pSC101 in E. coli K-12. J.Bacteriol. 137, 1095-1099.

/155/ Backhaus,H., Schmieger,H. (1979): Bacterial DNA synthesized under phage control in a dna-defective Salmonella mutant and packaged into a special fraction of transducing particles of phage P22.
Molec.gen.Genet. 171, 301-306.

/156/ Zinder,N.D., Lederberg,J. (1952): Genetic exchange in Salmonella. J.Bacteriol. 64, 679-699.

/157/ Konrad,E.B., Lehman,I.R. (1974): A conditional lethal mutant of E. coli K12 defective in the 5'->3' exonuclease associated with DNA polymerase I.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 2048-2051.

/158/ Kuempel,P.L., Veomett,G.E. (1970): A possible function of DNA polymerase in chromosome replication. Biochem.Biophys.Res.Commun. 41, 973-980.

/159/ Georgopoulos,C.P., Lam,B., Lundquist-Heil,A., Rudolph, C.F., Yochem,J., Feiss,M. (1979): Identification of the E. coli dnaK (groPC756) gene product. Molec.gen.Genet. 172, 143-149.

/160/ O'Donovan,G.A. (1978): Thymidin metabolism in bacteria (and "how, or how not, to label DNA"). In: DNA Synthesis: Present and Future. I. Molineux and M. Kohiyama (eds.), pp. 219-253, Plenum Press, New York.

Am Ende dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Schmieger für die Anregung zu dieser Arbeit, die stete Diskussionsbereitschaft und die Beratung bei der Versuchsdurchführung danken.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für die Möglichkeit diese Arbeit am Genetischen Institut der Universität München durchführen zu können;

Fr. U. Hamker für die Assistenz bei der Restriktionskartierung und der Anfertigung der Photographien;

Herrn Dr. H. Backhaus für die Gelphotographie;

den Labormitgliedern, allen voran Herrn Dr. W. Schwarz, für viele anregende Diskussionen;

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung

und nicht zuletzt allen Kollegen für die zur Verfügung gestellten Phagen- und Bakterienstämme.

Lebenslauf

Ich wurde am 11.09.1950 in Bad Tölz geboren als Tochter des Zahnarztes Dr. Ludwig Mulfinger, Lenggries und seiner Ehefrau Erika, geborene Becker.

Ab 1956 besuchte ich in Lenggries die Volksschule. Nach der 4. Klasse trat ich in das neusprachliche St.-Ursula-Gymnasium in Hohenburg bei Lenggries ein und legte 1969 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich an der Technischen Universität München das Studium der Biologie und Chemie für das höhere Lehramt. Im Sommersemester 1970 wechselte ich zum Fach Mikrobiologie und schloß im Juli 1975 mit dem Grad eines Diplom-Biologen ab. Seit November 1975 arbeitete ich an der Dissertation am Genetischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.